

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Mikrobiologie



**Bc. Eva Směliková**

Výskyt rezistence ke kolistinu u izolátů klinicky významných enterobakterií  
Colistin resistance in clinically important *Enterobacteriaceae*

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Jan Tkadlec, Ph.D.  
Konzultantka: Mgr. Marcela Krůtová, Ph.D.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3. 8. 2020

Podpis

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce Mgr. Janu Tkadlecovi, Ph.D. za konzultace a odborné vedení při psaní této diplomové práce. Za praktické rady a konzultace děkuji též Mgr. Marcele Krůtové, Ph.D. V neposlední řadě také děkuji za podporu své rodině, partnerovi a přátelům.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. Č. NV 18-09-00254. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

## Abstrakt

Kolistin je rezervním antibiotikem pro léčbu závažných infekcí způsobených bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae* a jinými gramnegativními bakteriemi vykazujícími mnohočetnou rezistenci k antibiotikům. Nedávno objevená plazmidově vázaná rezistence ke kolistinu mediovaná geny *mcr* však představuje vážné riziko omezení jeho použití. V předkládané diplomové práci byl kombinací selektivní kultivace a qPCR mapován výskyt *Enterobacteriaceae* nesoucích geny *mcr-1–8* u hospitalizovaných pacientů, cestovatelů, klinických izolátů rezistentních ke kolistinu a v retrospektivní sbírce klinických izolátů enterobakterií. Izoláty nesoucí geny *mcr* byly charakterizovány celogenomovým sekvenováním. Byla určena lokalizace genů *mcr*, identifikovány další geny rezistence a přítomné plazmidy. Byl charakterizován fyziologický profil vybraných izolátů *Escherichia coli* a bylo zjištěno, že za přítomnosti subinhibičního množství kolistinu může být favorizován kmen nesoucí gen *mcr-1*. V průběhu řešení diplomové práce byl popsán také gen *mcr-9*, jehož výskyt byl následně retrospektivně otestován. Izoláty *Enterobacter* spp. s detekovaným genem *mcr-9* byly většinou ke kolistinu citlivé, avšak v několika případech bylo možné rezistenci indukovat expozicí subinhibičním dávkám kolistinu. Výsledky diplomové práce ukazují, že výskyt plazmidově vázané rezistence v České republice je srovnatelný s ostatními evropskými státy, tedy je dosud relativně nízký a převládají kmeny *E. coli* nesoucí gen *mcr-1*. Tato rezistence má minimální vliv na fitness *E. coli*. Předběžné výsledky analýzy izolátů nesoucích nově popsáný gen *mcr-9* ukazují nebezpečí selhání terapie kolistinem u infekcí vyvolaných *Enterobacter* spp. nesoucích tento gen, v důsledku indukce kolistinové rezistence, avšak mechanismus tohoto fenoménu je nutné objasnit dalším výzkumem.

**Klíčová slova:** kolistin, rezistence, enterobakterie, antibiotika, *mcr*, polymyxiny, plazmid

## Abstract

Colistin is a last-resort antibiotic used to treat serious infections caused by *Enterobacteriaceae* and other multidrug resistant gram-negative bacteria. Recently discovered plasmid-borne colistin resistance, mediated by the *mcr* genes, poses a serious risk to colistin therapy. The aim of this diploma thesis was to map the occurrence of *Enterobacteriaceae* carrying the *mcr-1* to 8 genes in hospitalized patients, travellers, prospective colistin-resistant clinical isolates and in a retrospective collection of *Enterobacteriaceae* using a combination of selective cultivation and qPCR. Isolates with a detected *mcr* gene were characterized by Whole-Genome Sequencing. The localization of *mcr* genes was determined and other resistance genes and plasmids were identified. Furthermore, the physiological profile of selected colistin-resistant *Escherichia coli* isolates was characterized. In the presence of a subinhibitory amount of colistin, a strain carrying the *mcr-1* gene may be favored. Later, the *mcr-9* gene was described and its occurrence was subsequently tested retrospectively. *Enterobacter* spp. isolates carrying the *mcr-9* gene were mostly colistin-sensitive but, in some cases, resistance was induced after exposure to sublethal doses of colistin. The results of the study show that the incidence of plasmid-mediated colistin resistance in the Czech Republic is comparable to other European countries, in that it is still relatively low and *E. coli* carrying the *mcr-1* gene prevail. Furthermore, *mcr-1* mediated resistance has minimal effect on *E. coli* fitness. Preliminary results indicate there is a risk of colistin therapy failure in infections caused by *Enterobacter* spp. carrying the *mcr-9* gene due to the induction of colistin resistance. The mechanism of this phenomenon needs to be explained by further more detailed studies.

**Keywords:** Colistin, Resistance, *Enterobacteriaceae*, Antibiotics, *mcr*, Polymyxins, Plasmid

## Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíle práce .....	10
3	Přehled literatury .....	11
3.1	Charakteristika antibiotika kolistinu .....	11
3.1.1	Struktura kolistinu a mechanismus účinku .....	11
3.1.2	Nežádoucí účinky .....	12
3.2	Rezistence ke kolistinu.....	14
3.2.1	Rezistence ke kolistinu vázaná na chromozom .....	14
3.2.2	Získaná rezistence ke kolistinu vázaná na plazmid .....	20
3.3	Fenotypová rezistence ke kolistinu .....	25
3.4	Epidemiologie výskytu geneticky podmíněné rezistence ke kolistinu.....	27
3.4.1	Geografická distribuce genů <i>mcr</i> a jejich šíření.....	27
3.4.2	Výskyt u lidí.....	30
3.4.3	Potraviny, hospodářská zvířata, prostředí .....	32
4	Materiál a metody .....	35
4.1	Materiál .....	35
4.1.1	Prospektivní studie – střevní nosičství v nemocničním prostředí .....	35
4.1.2	Prospektivní studie – střevní nosičství u zdravé populace s cestovatelskou anamnézou .....	35
4.1.3	Prospektivní studie – klinické izoláty s prokázanou rezistencí ke kolistinu .....	35
4.1.4	Sbírka klinických izolátů <i>Enterobacteriaceae</i> .....	35
4.1.5	Primery pro PCR .....	36
4.1.6	Chemikálie a kity .....	37
4.2	Metody .....	38
4.2.1	Schéma průběhu experimentální části práce .....	38
4.2.2	Pomnožení a selektivní kultivace .....	38
4.2.3	Druhová identifikace .....	39
4.2.4	Testování citlivosti ke kolistinu mikrodiluční metodou.....	39
4.2.5	Izolace DNA.....	40
4.2.6	qPCR amplifikace .....	41
4.2.7	Sangerovo sekvenování.....	42
4.2.8	Celogenomová sekvenace .....	44
4.2.9	Bioinformatické metody.....	45
4.2.10	Test indukce rezistence ke kolistinu.....	45
4.2.11	Stanovení růstové rychlosti .....	46

4.2.12	Stanovení schopnosti kompetice .....	47
5	Výsledky .....	49
5.1	Studie výskytu genů <i>mcr</i> .....	49
5.1.1	Bezpríznakové nosičství u hospitalizovaných pacientů .....	49
5.1.2	Pacienti s cestovatelskou anamnézou .....	53
5.1.3	Klinické izoláty vykazující rezistenci ke kolistinu .....	55
5.1.4	Retrospektivní analýza sbírkových izolátů .....	58
5.1.5	Výsledky celogenomového sekvenování izolátů obsahujících gen <i>mcr</i> .....	60
5.2	Indukce kolistinové rezistence .....	62
5.3	Stanovení růstové rychlosti .....	66
5.3.1	Výběr izolátů .....	66
5.3.2	Výsledky porovnání růstové rychlosti .....	67
5.3.3	Celogenomové sekvenování .....	72
5.4	Stanovení schopnosti kompetice .....	73
6	Diskuze .....	75
6.1	Studie bezpríznakového střevního nosičství u hospitalizovaných pacientů .....	76
6.2	Izoláty od pacientů s cestovatelskou anamnézou .....	80
6.3	Klinické izoláty s prokázanou rezistencí ke kolistinu .....	81
6.4	Retrospektivní analýza .....	84
6.5	Fyziologické vlastnosti .....	86
6.5.1	Indukce kolistinové rezistence .....	86
6.5.2	Stanovení růstové rychlosti .....	88
6.5.3	Stanovení schopnosti kompetice .....	90
7	Závěr .....	91
8	Souhrn .....	93
9	Seznam použité literatury .....	94



## Přehled použitých zkratk

cgMLST	Core Genome Multilocus Sequence Type	Multilokusová sekvenční typizace vybraných částí genomu
cgST	Core Genome Sequence Type	Sekvenční typ pro metodu core genome MLST
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute	Ústav pro klinickou a laboratorní standardizaci
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control	Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí
EMA	European Medicines Agency	Evropská léková agentura
ESBL	Extended-spectrum beta-lactamases	Rozšířené spektrum betalaktamáz
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing	Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti
L-Ara4N	4-amino-4-deoxy-L-arabinose	4-amino-4-deoxy-L-arabinóza
LB	Luia-Bertani	Luria-Bertani
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem
<i>mcr</i>	Mobilized/modern colistin resistance	Přenosná/moderní kolistinová rezistence
MIC	Minimal Inhibitory Concentration	Minimální inhibiční koncentrace
MLST	Multilocus Sequence Typing	Multilokusová sekvenční typizace
NRL pro ATB	National Reference Laboratory for Antibiotics	Národní referenční laboratoř pro antibiotika
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
pEtN	Phosphoethanolamine	Fosfoetanolamin
sRNA	Small ribonucleic acid	Malá ribonukleová kyselina
ST	Sequence Type	Sekvenční typ pro metodu MLST
SÚKL	State Institute for Drug Control	Státní ústav pro kontrolu léčiv
WGS	Whole Genome Sequencing	Celogenomové sekvenování

# 1 Úvod

Používání antibiotik je v moderní medicíně nevyhnutelné, nejen pro léčbu bakteriálních infekcí, ale i v rámci prevence vzniku infekčních komplikací. Existence účinných antibiotik je také nezbytnou podmínkou umožňující úspěšně provádět komplikované chirurgické zákroky, jako jsou transplantace (Rice 2008). Vývoj nových antibiotik však v posledních letech stagnuje a je patrná narůstající rezistence k již dostupným lékům (Boucher et al. 2009). Antibiotická rezistence představuje jedno z nejzávažnějších zdravotních rizik tohoto století. Významným příkladem reprezentujícím problém antibiotické rezistence jsou bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* produkující karbapenemázy, enzymy poskytující bakteriím rezistenci k nejpokročilejším betalaktamovým antibiotikům (Center for Disease Dynamics; Economics & Policy 2015). Kvůli šíření rezistentních bakterií jsou lékaři nuceni využívat některá dříve používaná antibiotika, jako je například kolistin, jehož používání bylo dříve omezeno z důvodu popsané nefrotoxicity (Boucher et al. 2009). Kolistin společně s tigecyklinem zůstal mezi těmi antibiotiky, ke kterým je převážná část izolátů enterobakterií, včetně těch produkujících karbapenemázy, citlivá s výjimkou několika panrezistentních izolátů (Kumarasamy et al. 2010).

Až donedávna byla rezistence ke kolistinu detekována spíše výjimečně a zahrnovala bakterie s mutacemi v genech pro dvousložkové systémy, které regulují modifikaci lipopolysacharidu, tedy cíle působení kolistinu. Šíření této chromozomálně vázané rezistence je omezeno na šíření bakteriálních linií, u nichž se tato rezistence vyskytla, a nepředstavuje pro účinnost kolistinu bezprostřední hrozbu. V roce 2016 byl poprvé popsán gen způsobující rezistenci ke kolistinu vázaný na plazmid, který byl označen jako *mcr-1* (mobilized/modern colistin resistance). Tento gen kódující enzym pro modifikaci lipopolysacharidu je příčinou rezistence ke kolistinu, která je díky lokalizaci na plazmidu přenositelná horizontálním genovým transferem. Nadměrným využíváním kolistinu v zemědělství mohou být selektovány kmeny rezistentní k tomuto antibiotiku, což může vést k jejich šíření mezi zvířaty i lidskou populací (Liu et al. 2016). Dlouhodobá spotřeba kolistinu ve veterinární medicíně České republiky je však relativně nízká. Pohybuje se okolo 1 mg/PCU (Population Correction Unit), což znamená, že byl spotřebován 1 mg kolistinu na kilogram všech zvířat krmených tímto antibiotikem (jednotka bere v potaz velikost zvířecí populace a průměrnou hmotnost daného zvířecího druhu v kilogramech v daném roce). Maximální spotřeba kolistinu byla zaznamenána v roce 2013 s hodnotou 1,1 mg/PCU a do roku 2017 byl zaznamenán pokles spotřeby o 45 %. Je to dáno tím, že je kolistin z hlediska humánní medicíny kriticky významná a život zachraňující antimikrobiální látka, tudíž je kladen důraz na snižování jeho

spotřeby (ÚSKVBL 2019). Evropská léková agentura po objevu genu *mcr-1* doporučila snížit spotřebu kolistinu na maximální hladinu 5 mg/PCU, nejlépe pak pod hodnotu 1 mg/PCU (EMA 2020). Ve srovnání s Čínou, která v roce 2013 spotřebovala 545 mg/PCU kolistinu při chovu prasat a 622 mg/PCU u drůbeže (OECD 2018), se tedy spotřeba kolistinu v rámci veterinární medicíny v České republice dlouhodobě udržuje na nízkých hodnotách.

Vzhledem k funkci kolistinu jako rezervního antibiotika je nezbytné znát validní výsledky citlivosti, aby bylo možné nastavit optimální léčbu, a zavést metody umožňující monitorování výskytu a šíření kolistinové rezistence. Stanovení citlivosti ke kolistinu je však problematické. Nejrozšířenější metoda rutinního testování citlivosti, diskový difuzní test, ale i některé další používané komerční testy (E-test), neposkytují pro citlivosti ke kolistinu správné výsledky, a rezistentní izoláty tak mohou být falešně vyhodnoceny jako citlivé a naopak (Matuschek et al. 2017).

Kmeny nesoucí plazmid s genem *mcr* často kódují i další geny rezistence, zejména pak širokospektré betalaktamázy a karbapenamázy, a proto mohou být potenciálně selektovány také častým využíváním jiných antibiotik než samotného kolistinu (Skov a Monnet 2016). Enterobakterie patří mezi obávané patogeny způsobující zejména nozokomiální nákazy (Rice 2008) a spadají mezi bakterie s častým nosičstvím kolistinové rezistence. Celosvětový nárůst rezistencí k antibiotikům by mohl vést k častějšímu využívání kolistinu v humánní medicíně, což bylo důvodem pro výběr tématu předkládané diplomové práce.

## 2 Cíle práce

Cíle mé diplomové práce byly:

- Zmapovat prevalenci nosičství enterobakterií rezistentních ke kolistinu v nemocničním prostředí (u hospitalizovaných pacientů, jejich kontaktů a personálu) a zjistit podíl plazmidově vázané rezistence ke kolistinu.
- Zjistit zastoupení enterobakterií s prokázanou rezistencí ke kolistinu vázanou plazmidově u cestovatelů a cizinců žijících dlouhodobě v České republice, jakožto rizikové skupiny pro možné šíření multirezistentních patogenů.
- Zjistit zastoupení plazmidově vázané rezistence ke kolistinu mezi klinickými izoláty vykazujícími rezistenci k tomuto antibiotiku.
- Popsat fyziologický profil enterobakterií s plazmidově vázanou rezistencí ke kolistinu a porovnat jejich růstovou rychlost a kompetiční zdatnost s enterobakteriemi ke kolistinu citlivými.

Byly stanoveny následující hypotézy:

- Vzhledem k dostupným údajům z Evropy předpokládáme nízkou prevalenci nosičství genů *mcr* u hospitalizovaných pacientů. Vyšší prevalenci předpokládáme u cestovatelů, zejména u těch, kteří navštívili Asii.
- Předpokládáme vyšší zastoupení izolátů enterobakterií s chromozomálně vázanou rezistencí ke kolistinu než s rezistencí vázanou na plazmid.
- Předpokládáme, že fitness enterobakterií s rezistencí ke kolistinu vázanou na plazmid bude méně ovlivněná než u enterobakterií s kolistinovou rezistencí způsobenou chromozomální mutací.
- Dále si myslíme, že subinhibiční koncentrace kolistinu v kultivačním médiu zvýhodní růst enterobakterií rezistentních ke kolistinu, zejména kmenů s plazmidově vázanou rezistencí ke kolistinu, oproti enterobakteriím ke kolistinu citlivým.

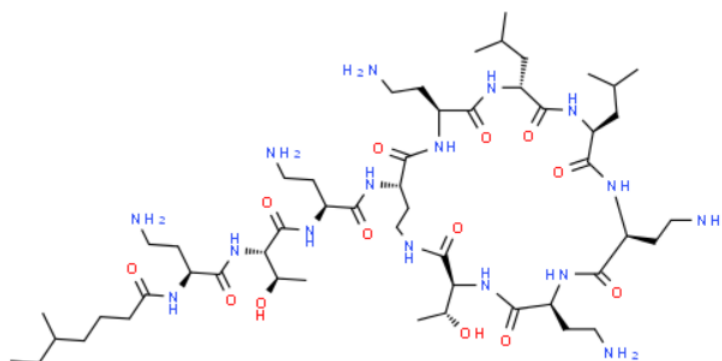
## 3 Přehled literatury

### 3.1 Charakteristika antibiotika kolistinu

Antibiotikum kolistin je produkováno kmeny *Paenibacillus polymyxa* var. *colistinus* (Koyama et al. 1950) a řadí se mezi polypeptidová antibiotika polymyxiny. V klinické praxi se používají dva typy polymyxinů s podobnou chemickou strukturou – kolistin (polymyxin E) a polymyxin B (Velkov et al. 2013). Obě zmíněná antibiotika se využívají pro léčbu infekcí způsobených multirezistentními gramnegativními bakteriemi, v Evropě se však v klinické praxi uplatňuje převážně kolistin. Proti grampozitivním a anaerobním patogenům vzhledem k mechanismu účinku na vnější membránu zůstávají neúčinná (Evans, Feola a Rapp 1999). V porovnání s humánní medicínou se kolistin častěji používá v zemědělství a veterinářství. Jedním z hlavních uživatelů kolistinu v zemědělství je Čína, která byla k roku 2015 na prvním místě v jeho používání také ve veterinářství, následovaná Indií a Dánskem. Asie obecně pak patří mezi nejvýznamnější výrobce a exportéry tohoto antibiotika (QYResearch Medical Research Centre 2015). Po zákazu používání kolistinu jako růstového faktoru v Číně od roku 2017 (Walsh a Wu 2016) však došlo k výraznému poklesu globální produkce kolistin sulfátu (QYResearch Medical Research Centre 2019). Seleční tlak způsobený enormním využíváním kolistinu ve veterinářství a zemědělství měl pravděpodobně za následek selekci a rozšíření enterobakterií s rezistencí vázanou na plazmidu (Liu et al. 2016).

#### 3.1.1 Struktura kolistinu a mechanismus účinku

Z hlediska chemické struktury (uvedené na obrázku 1) je kolistin kationtové, lipopeptidové antibiotikum, které obsahuje cyklický heptapeptid s tripeptidovým postranním řetězcem acylovaným na N konci mastnou kyselinou (Orwa et al. 2001).



Obrázek 1: Chemická struktura antibiotika kolistinu. Zdroj: CSID:4470591, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4470591.html> (ke dni 6. září 2019).

Klinicky je kolistin podáván ve dvou formách. Buď lokálně jako účinný kolistin sulfát, nebo parenterálně jako kolistin metansulfonát. Inhalačně pak lze podat obě formy, nicméně preferovaný je kolistin metansulfonát, jelikož kolistin sulfát může způsobovat

podráždění dýchacích cest (J. Li et al. 2005). Kolistin metansulfonát je méně toxický než kolistin sulfát, proto se používá pro parenterální podání (Schwartz et al. 1959). Příčina nižší toxicity je dána v účinku kolistin metansulfonátu jako prekurzoru, který pro dosažení antibakteriálních účinků musí nejprve v těle projít konverzí na aktivní formu (Bergen et al. 2006). Antibiotikum ve formě kolistin metansulfonátu prochází konverzí na aktivní formu jen z cca 30 %, zbylá část je běžně vylučovaná tubulární sekrecí (Couet et al. 2011). Oproti tomu aktivní kolistin je z těla vyloučen nerenální cestou (Garonzik et al. 2011). Terapeutický účinek kolistinu závisí na jeho koncentraci. Současná doporučení pro dávkování však mohou v některých případech (zejména u vážně nemocných pacientů) vystavovat bakterie subletálním koncentracím kolistinu, a být tak příčinou vzniku rezistence (Ortwine et al. 2015; Andersson a Hughes 2014).

Cílem působení kolistinu je vnější membrána gramnegativních bakterií, která je vlivem lipidu A negativně nabitá a jednotlivé molekuly lipidu A jsou spojeny kationty  $Mg^{2+}$  a  $Ca^{2+}$  (Hancock 1997). Pozitivně nabitě polymyxinové antibiotikum se na základě elektrostatických sil váže k lipidu A, přesný model působení polymyxinů nicméně zůstává neobjasněn. V současnosti se jeví jako nejpravděpodobnější elektrostatická vazba pozitivně nabitěho kolistinu k negativně nabitě membráně, která způsobí vložení hydrofobní domény antibiotika obsahující mastné acylové řetězce do vnější membrány a posun kationtů  $Mg^{2+}$  a  $Ca^{2+}$ . Posunem hořčnatých a vápenatých kationtů dojde k oslabení permeability membrány a úniku proteinů z periplazmy a zároveň je umožněn vstup látkám, které běžně membránou neprocházejí. Takovou látkou může být samotný kolistin, který umí proniknout periplazmatickým prostorem až k cytoplazmatické membráně, která je hlavním cílem účinku antibiotika. Mechanismus účinku na cytoplazmatickou membránu však zůstává nevysvětlen, pravděpodobně však dochází ke vzniku pórů a osmotické nerovnováze, která vede k lýzi buňky (Velkov et al. 2013; Trimble et al. 2016). Z uvedeného vyplývá, že polymyxiny jsou amfipatickými molekulami, přičemž jejich amfipatičnost je pravděpodobně klíčovou vlastností pro usmrcení bakterií prostřednictvím zvýšení permeability membrány (Pristovšek a Kidrič 1999). Vlivem vazby na lipid A, který je součástí endotoxinu, se navíc polymyxiny označují jako anti-endotoxiny, jelikož touto vazbou endotoxin neutralizují (Guo et al. 2007).

### 3.1.2 Nežádoucí účinky

Podle výsledků studií zaměřených na kolistinovou farmakodynamiku a farmakokinetiku u pacientů léčených kolistinem je zřejmé, že pro zvýšení efektivity léčby a pro omezení vzniku rezistence by bylo vhodné dávkování kolistinu navýšit. Limitujícím faktorem ovšem zůstává kolistinem indukovaná nefrotoxicita (Dalfino et al.

2012; Mohamed et al. 2012). V závislosti na podaném množství může být kolistin silně nefrotoxický. Histopatologické metody ukázaly poškození zejména proximální části renálních tubulů při dávkách 24 a 36 mg/kg/den, což bylo doprovázeno zvýšenou hladinou renálních biomarkerů značících poškození ledvin. Koncentrace 24 mg/kg/den byla navíc doprovázena mírnou tubulární dilatací a vakuolizací (zvětšováním) epiteliálních buněk a při dávce 36 mg/kg/den autoři studie pozorovali nekrózy epiteliálních tubulárních buněk. Zmíněné poškození nebylo doprovázeno zánětlivou reakcí ani cikatrizací (fibrózními změnami). Při dávce 12 mg/kg/den však bylo pozorováno pouze malé poškození ledvin s lokálními vakuolizacemi buněk. V klinické praxi představuje dávka 12 mg/kg/den nejvyšší možnou terapeutickou dávku u zdravých lidí (Ghlini et al. 2013) a porucha tubulárních buněk ledvin je navíc saturovatelná a ve většině případů reverzibilní proces, tudíž lze nefrotoxicitu omezit změnou četnosti podávání antibiotika na jedenkrát za den (Abdelraouf et al. 2012; Doshi et al. 2011). Přesto byl kolistin pro své toxické účinky brzy po svém uvedení do praxe v šedesátých letech 20. století nahrazen antibiotiky s méně škodlivými účinky na lidský organismus (J. Li et al. 2005).

V novější studii zkoumající nežádoucí účinky kolistinu však byly výsledky značně nepříznivější. Nefrotoxicita byla popsána už při dávkování 7,5 mg/kg/den, kdy byl pozorován nárůst hladiny malondialdehydu poukazujícího na renální poškození v důsledku oxidativního stresu a tubulární dilatace. V případě dávkování 15 mg/kg/den byla navíc sledována zvýšená hladina močovinného dusíku v krvi a sérového kreatininu značícího poškození ledvin a vážná tubulární nekróza. V obou případech bylo také pozorováno poškození mitochondrií, nicméně značně větší poškození bylo u dávky 15 mg/kg/den, což je dávka, která se v terapii běžně nepoužívá. Při dávce 7,5 mg/kg/den navíc docházelo k expresi markerů autofágie, která slouží k ochraně tubulárních buněk před poškozením způsobeným kolistinovou léčbou. Podle autorů studie je nefrotoxicita zapříčiněna kumulací antibiotika v ledvinných buňkách. Následkem kumulace dochází k poruchám činnosti mitochondrií a snížené aktivitě katalázy a superoxid dismutázy, vzniku kyslíkových radikálů, které poškozují strukturu i funkci proteinů, lipidů a DNA, čímž se aktivují kaspázy a následně dochází k apoptóze či nekróze (Dai et al. 2014).

Méně často byla pozorována také neurotoxicita. Důvodem je pravděpodobně inhibice uvolnění acetylcholinu či kompetitivní inhibice receptorů na neuromuskulární ploténce (McQuillen a Engbaek 1975; Kubikowski a Szreniawski 1963) projevující se nejčastěji parestézií, apnoí a dýchacími obtížemi, zvracením a nauzeou či závratěmi, méně pak myopatií, neuropatií, zmateností, psychickými poruchami a záchvaty (Koch-

Weser et al. 2013). Kolistin se tak zařadil mezi rezervní antibiotika a jeho použití se omezilo na případy, kdy standardní léčba selhává (Livermore 2002).

### 3.2 Rezistence ke kolistinu

K testování antibiotické citlivosti bakteriálních izolátů se v rutinní klinické mikrobiologii používá diskový difuzní test, případně mikrodiluční metoda pro stanovení hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC). Jelikož je kolistin rezervním antibiotikem, je žádoucí, aby byla správně stanovena jeho účinnost na základě určení bakteriální citlivosti. Bylo však zjištěno, že diskový difuzní test neposkytuje validní výsledky. Citlivost ke kolistinu stanoví pouze mikrodiluční metoda, která je však v klinické praxi využívána méně, jelikož je dražší a náročnější na přípravu než diskový difuzní test. Naneštěstí se diskový difuzní test pro stanovení citlivosti ke kolistinu donedávna na klinických pracovištích používal běžně, ale bohužel poskytuje pro kolistin falešné výsledky (bakterie je rezistentní, ale diskový difuzní test predikuje citlivost). U kmenů s plazmidově vázanou rezistencí ke kolistinu je navíc riziko špatně určené citlivosti vyšší vzhledem k MIC pohybující se pouze jedno nebo dvě ředění nad hraničním ředěním určujícím rezistencí. Neúčinnost metody je pravděpodobně dána obtížnou prostupností velké molekuly tuhým agarovým médiem (Matuschek et al. 2017).

#### 3.2.1 Rezistence ke kolistinu vázaná na chromozom

Až do objevení genů *mcr* byla rezistence vázaná na chromozom hlavním druhem rezistence k polymyxinovým antibiotikům. Jelikož tato rezistence zahrnuje pouze mutace chromozomálních genů, riziko šíření nebylo považováno za zásadní (Liu et al. 2016). Následující část textu se věnuje mechanismům, jimiž enterobakterie odolávají kolistinu, aniž by získaly geny rezistence horizontálním genovým transferem.

##### 3.2.1.1 Dvousložkový systém PmrA/PmrB

Chromozomálně vázaná rezistence vedoucí k nižší afinitě polymyxinů k bakteriálnímu povrchu je zpravidla dána modifikací lipidu A (Helander et al. 1996). Lipid A zajišťuje negativní náboj lipopolysacharidu, a proto bakterie vykazují afinitu ke kationtům, včetně kladně nabitého kolistinu. Modifikace lipidu A však vede k odstranění negativního náboje, což má za následek nižší afinitu polymyxinů k bakteriálnímu povrchu. Modifikace probíhá prostřednictvím připojení 4-amino-4-deoxy-L-arabinózy (L-Ara4N) a fosfoetanolaminu (pEtN), což je zajištěno expresí operonu *pmrHFIJKLM*. Tento operon kóduje enzymy pro syntézu a transfer L-Ara4N, což vede k rezistenci k polymyxinům (Haeili et al. 2017). Operon *pmrHFIJKLM* je pozitivně regulovaný dvousložkovým systémem PhoP/PhoQ a PmrA/PmrB. Aktivace transkripce genů pod kontrolou dvousložkového systému PmrA/PmrB vede ke změně náboje lipopolysacharidu. Běžně se tak děje za podmínek nízkého pH a nízké koncentrace



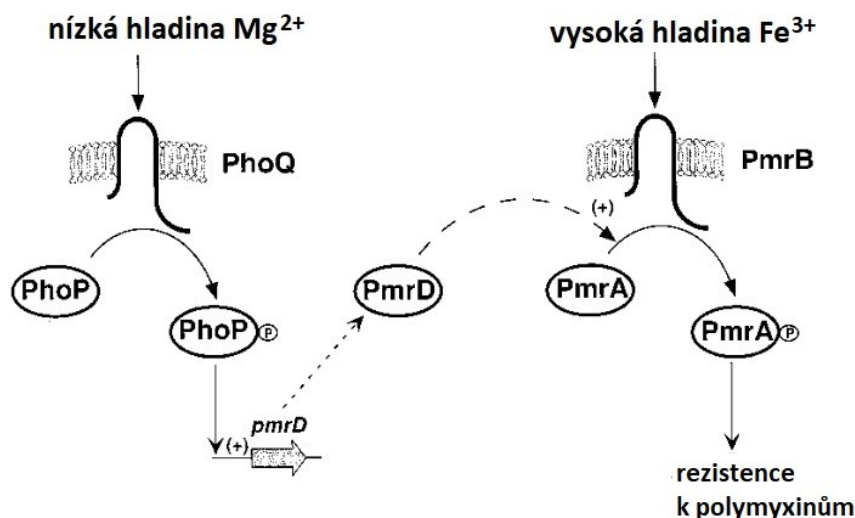
hořečnatých iontů, kdy změna náboje lipopolysacharidu vede k lepšímu přežívání bakteriální buňky (Groisman, Kayser a Soncini 1997). Možným fyziologickým vysvětlením modifikace je, že lipopolysacharid obsahuje vazebná místa pro  $Mg^{2+}$  a při změně náboje se ionty hořčíku z lipopolysacharidu uvolní a transportují do buňky, kde je jejich nedostatek. Tento souběžný děj, primárně sloužící k zajištění iontů hořčíku buňce v prostředí limitovaném na hořčík, tak sekundárně zajistí i rezistenci ke kolistinu (Groisman, Kayser a Soncini 1997). Pro změnu náboje stačí záměna jednoho nukleotidu v sekvenci senzorové kinázy PmrB (Cannatelli et al. 2014). Při správném fungování dvousložkového systému PmrA/PmrB u *Salmonella enterica* je senzorická histidinová kináza PmrB aktivována i dalšími environmentálními signály, jako je vysoká koncentrace trojmocného železa (Chamnongpol et al. 2002). Ionty železa se vážou na protein PmrB (Wösten et al. 2000), což vede k jeho autofosforylaci. PmrB přenesení fosfát na regulátor PmrA (Wösten a Groisman 1999), který spustí expresi UDP-glukóza dehydrogenázy *pmrE* a operonu *pmrHFJIKLM*, které jsou zodpovědné za syntézu L-Ara4N a pEtN a následně i za modifikaci lipidu A (Gunn et al. 1998, 2000). Delece dvousložkového systému PmrA/PmrB vede ke zvýšené vazbě trojmocného železa na bakteriální buňku, které následně poškozuje vnější membránu (Chamnongpol et al. 2002).

Nulová mutace, tedy mutace zcela bránící fungování PmrA/PmrB, vede k 8000× vyšší citlivosti k polymyxinům, než bylo pozorováno u divokého typu. Z uvedeného plyne, že přítomnost systému PmrA/PmrB je pro polymyxinovou rezistenci nezbytná (Wösten et al. 2000). Pokud ale dojde pouze k nukleotidové záměně thyminu za guanin na pozici 245 genu *pmrB*, dojde ve výsledném proteinu k záměně leucinu za arginin v pozici 82, následkem čehož systém PmrA/PmrB nepotřebuje pro svou aktivaci signál. To vede ke zvýšené expresi genu *pmrK*, zvýšené modifikaci lipopolysacharidu a rezistenci ke kolistinu. Tento jev byl popsán u izolátu *K. pneumoniae* (Cannatelli et al. 2014). Dvousložkový systém PmrA/PmrB zodpovědný za modifikaci lipidu A připojením pEtN (ale nikoliv L-Ara4N) způsobující kolistinovou rezistenci byl popsán také u izolátu *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium (Murray et al. 2007).

### 3.2.1.2 Dvousložkový systém PhoP/PhoQ a protein PmrD

Expresí genů závislých na aktivaci systémem PmrA/PmrB může být spuštěna i dvousložkový systém PhoP/PhoQ (Kox, Wösten a Groisman 2000). Ten se spouští v reakci na nízké pH či přítomnost antimikrobních látek, což jsou signály umožňující rozpoznat pozření makrofágem. Tento jev byl pozorován u izolátu *S. enterica* (Bader et al. 2005; Aranda et al. 1992). Případně také reaguje na nízkou hladinu hořečnatých iontů. Systém PhoP/PhoQ v reakci na nedostatek hořečnatých iontů odpovídá expresí regulátoru PmrD. PmrD pozitivně reguluje systém PmrA/PmrB, a je tak konektorem obou

dvousložkových systémů, což popsali autoři Kox et al. u izolátu *S. enterica*. Taková aktivace je ovšem závislá na přítomnosti funkčního proteinu PmrA, tudíž bez jeho správné funkce k této regulaci nedochází. Mutanti s chybami v genu *pmrD* jsou tak citliví k polymyxinům, pokud rostou za nízké koncentrace hořčíku, ale zůstávají rezistentní k polymyxinům za vysoké koncentrace železa, jelikož dojde ke spuštění rezistence autonomním systémem PmrA/PmrB. Systém PmrA/PmrB nezávisle na PhoP/PhoQ i regulátoru PmrD modifikuje lipid A (Kox, Wösten a Groisman 2000). Protein PmrD propojující oba dvousložkové systémy PmrA/PmrB a PhoP/PhoQ byl popsán také u *Escherichia coli*. Při kultivaci za snížené dostupnosti hořečnatých iontů byla pozorována rezistence ke kolistinu prostřednictvím modifikace lipidů A připojením pEtN a L-Ara4N i v mutantním fenotypu postrádajícím systém PhoP/PhoQ. Při delecí systému PhoP/PhoQ i proteinu PmrD k modifikaci lipidů A nedochází. Z uvedeného plyne, že PmrD může být aktivován i nezávisle na svém primárním transkripčním aktivátoru PhoP. Polymyxinová antibiotika kompetují s hořečnatými ionty o vazbu k senzorové kináze PhoQ, a mohou tak tento dvousložkový systém aktivovat, což ve výsledku vede k rezistentnímu fenotypu (Rubin et al. 2015). Oba dvousložkové systémy a jejich vliv na rezistenci k polymyxinům přehledně shrnuje obrázek 2.



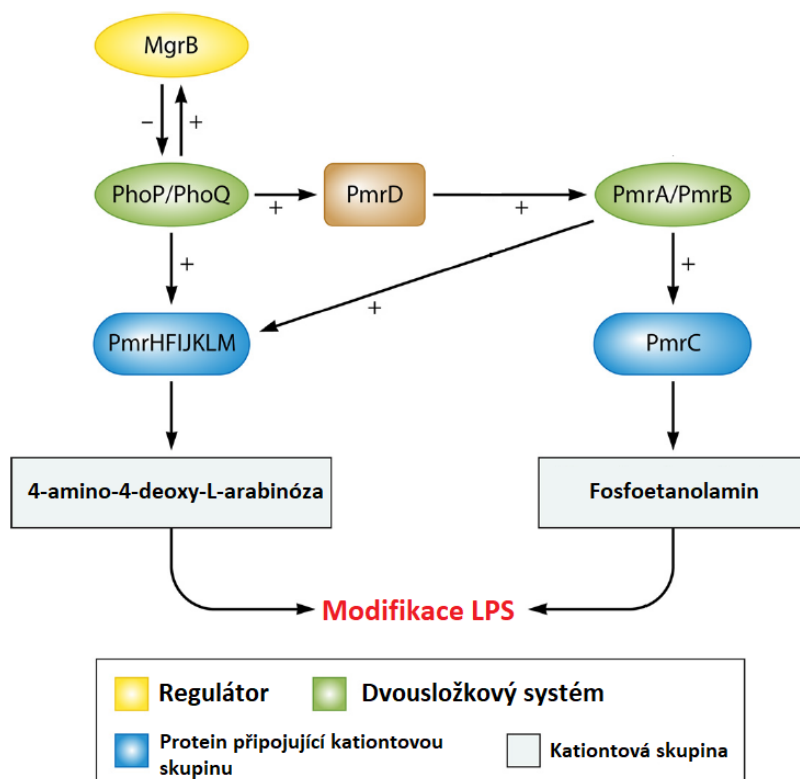
Obrázek 2: Aktivace dvousložkového systému PmrA/PmrB může být ovlivněna dvousložkovým systémem PhoP/PhoQ. Za podmínek nízké koncentrace iontů hořčíku dochází k aktivaci transkripce genů pod kontrolou PmrA za přispění dvousložkového systému PhoP/PhoQ přes indukci proteinu PmrD (levá strana obrázku). Za podmínek vysoké koncentrace iontů železa (pravá strana obrázku) však může být transkripce aktivována i nezávisle na systému PhoP/PhoQ. Upraveno podle (Kox, Wösten a Groisman 2000).

### 3.2.1.3 Negativní regulátor MgrB a protein PmrC

Zvýšení exprese dvousložkového systému PhoP/PhoQ lze dosáhnout inaktivací jeho negativního regulátoru MgrB, což bylo popsáno u izolátu *K. pneumoniae*. Inaktivace negativního regulátoru MgrB tedy zvýší expresi operonu *pmrHFIJKLM*, což vede

k modifikaci lipopolysacharidu a následné bakteriální rezistenci k polymyxinům (Cannatelli et al. 2013). Jednou z příčin inaktivace negativního regulátoru MgrB je inserce transpozonu. Autoři studie popsali mechanismus rezistence ke kolistinu způsobený insercí elementu *ISKpn13* (patřící do rodiny IS5-like) či transpozonu *ISKpn14* (patřící do rodiny ISI) do sekvence genu *mgrB*. Podobným mechanismem je vložení inserční sekvence *IS10R* do promotorové oblasti proteinu MgrB či substituce vedoucí k předčasné terminaci. Všechny inserce vedly ke kolistinové rezistenci, což bylo prokázáno komplementační analýzou s nativním proteinem MgrB, po které byla obnovena citlivost ke kolistinu (Villegas, Ozdamar a Poirel 2015).

U izolátu *S. enterica* byla popsána fosfoetanolamin transferáza PmrC, která je aktivovaná dvousložkovým systémem PmrA/PmrB a je zodpovědná za modifikaci lipopolysacharidu fosfoetanolaminem. PmrC je membránový protein s velkou periplazmatickou doménou lokalizovaný ve vnitřní bakteriální membráně. Vnitřní membrána obsahuje vysoký podíl fosfatidyletanolaminu, který slouží jako donor pEtN pro modifikaci. Mutant s nefunkčním genem *pmrC* tak není schopen modifikovat lipid A fosfoetanolaminem, což je nezbytné pro zajištění rezistence k polymyxinům (Lee et al. 2004). Na obrázku 3 lze přehledně vidět regulační dráhu vedoucí k modifikaci lipidu A a rezistenci k polymyxinům.



Obrázek 3: Regulační dráha propojující dva dvousložkové systémy PhoP/PhoQ a PmrA/PmrB, které aktivací příslušných regulátorů vedou k modifikaci lipidu A (LPS) 4-amino-4-deoxy-L-arabinózou a fosfoetanolaminem, což má za následek pozitivní náboj na bakteriální membráně a rezistenci k polymyxinům. Upraveno podle (Poirel, Aurélie a Nordmann 2017).

#### 3.2.1.4 Malé regulační RNA MgrR a SroC

Senzorová kináza PhoQ v reakci na nízkou koncentraci  $Mg^{2+}$  v prostředí fosforyluje regulátor PhoP (Groisman, Kayser a Soncini 1997). V reakci na to se kromě transportérů hořčiku syntetizuje také malá regulační RNA (sRNA) MgrR. sRNA MgrR popsaná u *E. coli* negativně reguluje expresi genu pro fosfoetanolamin transferázu *eptB*, jehož produktem je enzym modifikující lipopolysacharid. Mutant s nefunkčním MgrR vykazuje desetkrát vyšší rezistenci k polymyxinům než divoký kmen, naopak mutant s delecí *eptB*, stejně jako dvojitý mutant v *eptB* a *mgrR*, má podobnou citlivost jako divoký kmen (Moon a Gottesma 2009). Antagonistou k MgrR je sRNA SroC, která se váže na MgrR, a stává se tak nepřímým aktivátorem enzymu EptB. Z uvedeného plyne, že MgrR a SroC mohou být klíčové molekuly v rezistenci ke kolistinu, jejich přesná role však není ještě zcela objasněna (Acuña et al. 2016).

#### 3.2.1.5 Dvousložkový systém CrrB/CrrA

Zatím málo prozkoumaným mechanismem chromozomálně vázané rezistence ke kolistinu je mutace ve dvousložkovém systému CrrB/CrrA, který byl popsán pouze u izolátu *K. pneumoniae*. U mutantů v histidinové kináze CrrB, kteří vykazují zvýšenou míru autofosforylace kinázy CrrB, byla pozorována zvýšená modifikace lipidu A. Děje se tak pravděpodobně prostřednictvím modulátoru CrrC, který zvyšuje aktivitu dvousložkového systému PmrA/PmrB, což má za následek aktivaci transkripce operonu *pmrHFIJKLM* a syntézu L-Ara4N a pEtN. Hodnota MIC kolistinu vzrostla z hodnoty  $<0,5 \mu\text{g/ml}$  u divokého kmene na  $>16 \mu\text{g/ml}$  u fenotypu mutantního v kináze CrrB. Pro kolistinovou rezistenci v tomto případě stačí substituce leucinu za methionin na pozici 94, či glutaminu za leucin na pozici 10 (Wright et al. 2015; Cheng et al. 2016). Bylo též pozorováno, že substituční mutace v genu *crrB* vede ke zvýšené expresi efluxní pumpy H239\_3064, což má za následek nejen kolistinovou rezistenci, ale též rezistenci k tetracyklinům a tigecyklinu, který je rovněž antibiotikem poslední volby. Fyziologická role dvousložkového systému CrrB/CrrA, stejně jako proteinu CrrC však zatím zůstává neobjasněna, nicméně bylo zjištěno, že CrrC není esenciální pro bakteriální růst a variabilně se vyskytuje v genomu *K. pneumoniae* (Cheng et al. 2018).

#### 3.2.1.6 Geny *lpxM* a *yciM*

Zatím málo popsané mechanismy rezistence ke kolistinu odhalila celogenomová sekvenace izolátů *K. pneumoniae* pocházejících od pacientů léčených kolistinem na jednotce intenzivní péče. Populace *K. pneumoniae* produkující širokospektré betalaktamázy vykazovala heterorezistentní fenotyp, tedy v rámci klonální populace byly nalezeny izoláty s mutacemi v genech *lpxM* a *yciM*, které kódují proteiny pro regulaci syntézy lipidu A. Stačila jedna nesynonymní jednonukleotidová mutace v genu *yciM*

vedoucí k záměně valinu za glycin na pozici 43, aby se z citlivého kmene stal kmen rezistentní. Protein YciM negativně reguluje syntézu lipidu A, tedy při jeho mutaci dochází ke zvýšené produkci lipopolysacharidu. Možným vysvětlením rezistence je tedy vyvážení destabilizačního účinku kolistinu nadprodukcí lipopolysacharidu. Podobná situace byla popsána i u genu *lpxM*, kde rozdíl mezi citlivým a rezistentním kmenem spočíval pouze ve dvou jednonukleotidových polymorfizmech. Pro potvrzení významu zmíněných genů v kolistinové rezistenci byl do citlivého kmene elektroporován plazmid mutovaný v genu *yciM*, což vedlo k trojnásobnému nárůstu MIC. Stejný pokus byl zopakován s genem *lpxM*, kdy došlo k nárůstu MIC dvakrát až čtyřikrát (v závislosti na bakteriálním kmenu). Detailnější vysvětlení rezistence u kmenů mutovaných v genech *yciM* a *lpxM* však vyžaduje další výzkum. Výskyt heterorezistence, kdy malá subpopulace bakterií po expozici kolistinu vykazuje rezistentní fenotyp, by měl být impulzem pro zavádění lepších diagnostických metod testování citlivosti (Mahalakshmi et al. 2014; Halaby et al. 2016).

Dosud známé mechanismy rezistence ke kolistinu vázané na chromozom a popsané u enterobakterií jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled chromozomálně vázaných mechanismů rezistence ke kolistinu (Poirel, Aurélie a Nordmann 2017; Halaby et al. 2016).

Gen	Název	Účinek
<i>pmrC</i>	Fosfoetanolamin fosfotransferáza	Přidání fosfoetanolaminu k lipopolysacharidu
operon <i>pmrHFIJKLM</i> a gen <i>pmrE</i>	UDP-glukóza 6-dehydrogenáza ( <i>pmrE</i> )	Syntéza L-aminoarabinózy a připojení k lipidu A
<i>pmrA</i> a <i>pmrB</i>	Dvousložkový systém obsahující tyrozin kinázu PmrB a regulátor PmrA	Aktivace transkripce operonu <i>pmrCAB</i> , <i>pmrHFIJKLM</i> a <i>pmrE</i>
<i>phoP</i> a <i>phoQ</i>	Dvousložkový systém obsahující kinázu PhoQ a regulátor PhoP	Aktivace transkripce operonu <i>pmrHFIJKLM</i> a proteinu PmrA (přímo nebo nepřímo přes PmrD)
<i>mgrB</i>	Inhibitor kinázy PhoQ	Jeho inaktivace vede k nadměrné expresi operonu <i>phoPQ</i> .
operon <i>crrAB</i>	Dvousložkový systém obsahující kinázu CrrB a regulátor CrrA	Mutace genu <i>crrB</i> vede k nadměrné expresi <i>pmrCAB</i> .
<i>yciM</i>	Protein napomáhající sestavení lipopolysacharidu	Mutace v genu vede ke kumulaci lipopolysacharidu.
<i>lpxM</i>	Acyltransferáza	Mutace v genu vede ke změně acylace lipidu A.

### 3.2.1.7 Další mechanismy rezistence ke kolistinu

Rezistence ke kolistinu může být také způsobena substitučními mutacemi v genech spojených se syntézou vnější membrány. Příkladem jsou mutace v genech popsanych u *K. pneumoniae* zahrnující gen *waaL* kódující O-antigen ligázu, *rfbA* kódující dTDP-glukóza pyrofosforylázu potřebnou pro syntézu O-antigenu či *vacJ*, jehož mutace vedou mimo jiné také k rezistenci k surfaktantům. Tyto mutace jsou unikátní pro každý kmen a není zcela jasné, jestli jsou dostačující pro vznik rezistence ke kolistinu. Pravděpodobně budou odvozeny z mutací, kvůli kterým vzniká rezistence na povrchově aktivní látky. Z uvedeného plyne, že možným selekčním tlakem vzniku takových mutací je často nesprávné používání dezinfekcí v laboratořích a nemocnicích (Sassera et al. 2014).

Bylo také zjištěno, že nedostatek hořčnatých iontů, který je spouštěčem kolistinové rezistence, může být způsoben přítomností extracelulární DNA. Extracelulární DNA je jednou z komponent biofilmu, kde chelatuje a váže ionty hořčíku. U izolátu *S. enterica* sérovar Typhimurium bylo pozorováno, že biofilm vykazuje zvýšenou expresi operonu *pmrHFIJKLM* právě vlivem extracelulární DNA, která snižuje koncentraci dostupného hořčíku, což ve výsledku vede k rezistenci k polymyxinům výše popsaným způsobem (Johnson et al. 2013).

### 3.2.2 Získaná rezistence ke kolistinu vázaná na plazmid

Až donedávna byla rezistence ke kolistinu známá pouze jako chromozomálně vázaná, tedy vznikající díky mutacím chromozomálních genů. Díky tomu nebylo šíření této rezistence považováno za významný problém. Jako opak získané rezistence (chromozomální i plazmidové) byla popsána také rezistence vnitřní, inherentní. Přirozená rezistence je způsobena stejně jako v případě získané rezistence modifikací lipopolysacharidu připojením L-Ara4N a pEtN prostřednictvím operonu *pmrHFIJKLM* a proteinu PmrC (Aquilini et al. 2014; Sidorczyk, Zähringer a Rietschel 1983; Haeili et al. 2017). Bakterie rodu *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* a *Serratia* spadající do čeledi *Enterobacteriaceae* jsou ke kolistinu přirozeně rezistentní (Leclercq et al. 2013), a proto se jimi ve své diplomové práci blíže nezabývám.

#### 3.2.2.1 Objev výskytu genů *mcr*

V roce 2016 autoři čínské studie poprvé detekovali geny zodpovědné za rezistenci k polymyxinům na plazmidu *E. coli*. Gen rezistence byl označen jako *mcr-1*. Autoři dále prokázali možnost horizontálního genového transferu této kolistinové rezistence. Kmen *E. coli* SHP45 byl schopen konjugací přenést geny rezistence na kmen *E. coli* C600 s vysokou frekvencí  $10^{-1}$  až  $10^{-3}$  buněk na příjemce. Minimální inhibiční koncentrace kolistinu u transkonjugantů vzrostla  $8\times$  až  $16\times$  v porovnání s kontrolními vzorky



bez konjugace (0,5 mg/l u vzorků bez konjugace versus 4 až 8 mg/l po konjugaci). U dalších kmenů jako je *K. pneumoniae* produkující karbapenemázy, *Pseudomonas aeruginosa* či jiných kmenů *E. coli* autoři prokázali schopnost tyto geny přijímat transformací se stejným nárůstem MIC jako v prvním případě u transkonjugantů. Gen *mcr-1* je stabilním genem rezistence v případě *E. coli* SHP45 i *E. coli* C600, a to za přítomnosti i nepřítomnosti kolistinu (Liu et al. 2016).

Protein MCR-1 je evolučně blízký příbuzný fosfoetanolamin transferázám izolovaným z bakterií *Paenibacillus sophorae*, které produkují polymyxiny. Vysoká frekvence přenosu mezi klinicky významnými bakteriálními patogeny představuje potenciální hrozbu rozšíření rezistence ke kolistinu a z ní vyplývající globální zdravotní riziko (Liu et al. 2016), což je navíc umocněno skutečností, že se tyto geny výjimečně mohou začlenit i do chromozomální DNA (Wu et al. 2018). Integrací do chromozomu může dojít k fixaci genu *mcr-1* v rámci konkrétní bakteriální populace, což by umožnilo stabilní vertikální šíření genu rezistence z generace na generaci (Zajac et al. 2019).

Na riziko spojené s šířením plazmidově vázané rezistence ke kolistinu reagovalo Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC) vydáním dokumentu Rapid Risk Assessment. Vyzývá v něm k monitorování přítomnosti genů *mcr* na národní úrovni za účelem stanovení prevalence plazmidově vázané rezistence ke kolistinu a k zavedení kroků nezbytných pro zamezení jejího šíření. Testování citlivosti v rámci monitorování šíření kolistinové rezistence je doporučeno provádět výhradně pomocí stanovení MIC mikrodiluční metodou, která poskytuje nejvalidnější výsledky. Pro potvrzení přítomnosti genů *mcr* je doporučena kombinace cílově specifické PCR a celogenomového sekvenování pro bližší charakterizaci kmene a plazmidu. Jedním z cílů stanovených ECDC je stanovení genetických markerů skrze plazmidově vázané geny *mcr*, identifikace enterobakterií s rozšířenou rezistencí k antibiotikům a zmapování jejich šíření v rámci Evropské unie. Také bylo doporučeno snížit užívání kolistinu v zemědělství, zejména při chovu zvířat určených ke konzumaci, aby nedocházelo k selekčnímu tlaku, který může zvýšit distribuci potravin infikovaných enterobakteriemi rezistentními ke kolistinu spotřebitelům. K tomu je nutná spolupráce humánní a veterinární medicíny (ECDC: Stockholm 2016).

### 3.2.2.2 Varianty genů *mcr*

Od prvního objevu bylo detekováno již deset variant genů *mcr* (Dalmolin, Lima-Morales a Barth 2018; Kieffer et al. 2019; C. Wang et al. 2020). Gen *mcr-2* byl popsán u izolátu *E. coli* izolovaného z belgických prasat a skotu v roce 2016 (Xavier et al. 2016). V následujícím roce byly popsány další geny *mcr-3* až *mcr-6*, kdy gen *mcr-3* byl objeven u prasečího izolátu v Číně (W Yin et al. 2017), *mcr-4* u prasečích izolátů *E. coli*

a *Salmonella* v Belgii, Španělsku a Itálii (Carattoli et al. 2017), *mcr-5* u drůbežního izolátu *Salmonella* Paratyphi B v Německu (Borowiak et al. 2017) a *mcr-6* u prasečího izolátu *Moraxella pluranimalium* ve Velké Británii (AbuOun et al. 2017). V roce 2018 byly popsány geny *mcr-7* a *mcr-8* u izolátů *K. pneumoniae* izolovaných z kuřat (*mcr-7* i *mcr-8*), prasat a od lidí (*mcr-8*) v Číně (Y. Yang et al. 2018; X. Wang et al. 2018).

Relativně nově objevená varianta genu nesoucí mobilní rezistenci ke kolistinu *mcr-9* byla identifikována v roce 2019 na plazmidu IncHI2 bakterie *Salmonella enterica* sérotyp Typhimurium. Po provedení mikrodiluční metody však nebyla pozorována rezistence ke kolistinu odpovídající hraničním koncentracím vymezeným organizací European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Po naklonování genu do *E. coli* již byla pozorována MIC 2,5 mg/l kolistinu (Carroll et al. 2019). Protein MCR-9 funguje jako jiné MCR proteiny, tedy jde o fosfoetanolamin transferázu modifikující lipopolysacharid gramnegativních bakterií. Citlivost k polymyxinům však zůstává ve většině případů zachována a gen se šíří nepozorovaně. Autoři Kieffer et al. v rámci své studie zjistili, že ač jsou kmeny nesoucí gen *mcr-9* citlivé ke kolistinu, rezistence může být vyvolána nízkými (subinhibičními) dávkami tohoto antibiotika. Dále bylo pozorováno, že nárůst exprese genu *mcr-9* roste se vzrůstající koncentrací kolistinu, kterému je kmen vystaven. Zároveň nebyla pozorována změna v počtu kopií plazmidů nesoucích tento gen, ani nebyly pozorovány mutace v chromozomu, které by potenciálně mohly vést k rezistenci ke kolistinu. Z toho plyne, že exprese genu *mcr-9* je inducibilní a může být aktivována nízkými dávkami kolistinu, což může hypoteticky způsobit selhání léčby. Zmíněný jev nebyl pozorován po vystavení kmene ampicilinu, či při pokusu s kmenem obsahujícím gen *mcr-1*. Autoři dále pozorovali, že pro zmíněnou inducibilní expresi je nutná přítomnost dvousložkového systému QseC/QseB, jejichž geny leží ve směru transkripce (downstream) od genu *mcr-9*. Bez tohoto systému nelze navodit expresi *mcr-9* ani za přítomnosti kolistinu (Kieffer et al. 2019). Při absenci senzorové kinázy QseC může být regulátor odpovědi QseB fosforylován (ale nikoli defosforylován) kinázou PmrB, která je součástí dvousložkového systému PmrA/PmrB. Za takových podmínek je regulátor odpovědi QseB trvale aktivovaný (Rubin et al. 2015; Guckes et al. 2013). Význam pro expresi genu *mcr-9* a rezistenci ke kolistinu však zatím nebyl popsán.

Gen *mcr-9* byl také popsán u kmene *Enterobacter hormaechei* izolovaného v jednom případě od pediatrického pacienta, ve druhém případě od dospělého pacienta v septickém stavu. U zmíněných izolátů byla navíc pozorována produkce metalobetalaktamáz (Chavda et al. 2019; Yuan et al. 2019).



Zatím nejnověji objevený a dosud nepříliš popsán gen *mcr-10* byl identifikován v roce 2020 u izolátu *Enterobacter roggenkampii*. Kmen izolovaný v roce 2016 pocházel z ascitu pacienta čínské nemocnice a izolát byl rezistentní k aztreonamu, ceftazidimu, imipenemu a meropenemu, ale nikoli ke kolistinu, ke kterému vykazoval MIC 1 mg/l, a citlivý byl také k tigecyklinu. Po naklonování genu *mcr-10* do jiného citlivého kmene *E. roggenkampii* však došlo ke čtyřnásobnému nárůstu hodnoty MIC kolistinu (4 mg/l), což jednoznačně ukazuje na rezistenci mediovanou genem *mcr-10*. Mechanismus však ještě není objasněn (C. Wang et al. 2020).

Gen *mcr-10* kóduje enzym fosfoetanolamin transferázu a aminokyselinové složení proteinu MCR-10 sdílí vysokou podobnost s proteinem MCR-9 (82,93 % aminokyselinové podobnosti). Možný původ ukazuje na bakterii *Buttiauxella agrestis* či *B. gaviniae*, u nichž byl nalezen protein fosfoetanolamin transferáza sdílející aminokyselinovou shodu kolem 80 % s proteinem izolátu *E. roggenkampii* a podobnost byla pozorována také na strukturní úrovni. Zmíněné bakterie ovšem mají gen inkorporovaný do chromozomu, mezi enterobakteriemi se však šíří pomocí horizontálního genového transferu v rámci kompozitního transpozonu. U *E. roggenkampii* byl detekován na plazmidu IncFIA. Gen byl následně nalezen i u jiných izolátů patřících k rodům *Citrobacter* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Kluyvera* spp. a *Raoultella* spp., nicméně převážná část izolátů pozitivních pro přítomnost genu *mcr-10* patřila do rodu *Enterobacter* spp. (24/35). Gen *mcr-10* byl nalezen u asijských, amerických, evropských i australských izolátů, a to zejména u humánních vzorků, nicméně také u vzorků zvířat a vzorků izolovaných ze životního prostředí, nejstarší izolát pak pocházel z roku 1988, což ukazuje na jeho dlouhodobé globální šíření (C. Wang et al. 2020).

### 3.2.2.3 Vliv genů *mcr* na fitness bakteriálních izolátů

Častými nositeli genů *mcr-1* jsou plazmidy pHNSHP45 (IncI2), pHNSHP45-2 (IncHI2), pHNSHP23 (IncX4) a pHNSHP17 (IncY). Během testování kompetiční zdatnosti bylo zjištěno, že jsou tyto plazmidy stabilní. Ani po 96 hodinách inkubace izolátu *E. coli* obsahujícího plazmidy s geny *mcr-1* s izoláty bez těchto plazmidů nedošlo k jejich ztrátě. Ke ztrátě plazmidů pHNSHP45, pHNSHP45-2, pHNSHP23 a pHNSHP17 nedošlo ani při 14denním pasážování buněk bez přítomnosti kolistinu. Transformanty s plazmidy pHNSHP45 (IncI2) nebo pHNSHP23 (IncX4) navíc při kultivaci dosahovaly vyšších koncentrací než rodičovský kmen bez těchto plazmidů. Z toho lze usuzovat pozitivní vliv na fitness bakterie. Díky kompetiční výhodě jsou tyto dva plazmidy hlavními přenašeči genu *mcr-1* a pravděpodobně nahradily jiné plazmidy jako IncHI2, IncFII a IncY (Wu et al. 2018).

Experimentálně bylo zjištěno, že exprese genů vázaných na plazmid snižuje fitness svého hostitele, což však bylo zpochybněno ve studii z roku 2017. V ní autoři sice potvrdili snížený růst, změnu v morfologii membrány, zvýšenou citlivost k dalším antibiotikům a někdy i odumření *E. coli*, která po 14denním pasážování s narůstající koncentrací kolistinu vykazovala vysoce rezistentní fenotyp, zároveň však pozorovali, že divoké kmeny bakterií, které získají horizontálním genovým transferem přirozeně se vyskytující plazmid s geny *mcr*, nemají zhoršený růst, a tedy není ovlivněno jejich fitness. Proto je u divokých kmenů s rezistencí ke kolistinu pozorována jen mírně zvýšená hodnota MIC (4 až 8 mg/l) v porovnání s kmeny, které nesou chromozomálně vázanou rezistenci (zde hodnoty MIC dosahují až 256 mg/l). Počet kopií plazmidů s geny *mcr* navíc bývá obvykle nízký. V jednom případě však byl pozorován vysoce rezistentní izolát s vysokou expresí genu *mcr-1*, u kterého ale nebylo ovlivněno fitness. Autoři tedy navrhli hypotézu, že bakterie mohou zvýšeně exprimovat geny *mcr* i bez větších nákladů na fitness díky kompenzačním mutacím (Q. Yang et al. 2017).

Vliv genu *mcr-1* na fitness bakterie zkoumali také autoři Tietgen et al., kteří transformovali plazmid pKP2442 obsahující gen *mcr-1* do izolátů *E. coli* a *K. pneumoniae* a transkonjuganty následně porovnali s rodičovským kmenem bez mobilní kolistinové rezistence. Výrazný vliv na fitness (zahrnující růstovou rychlost, cytotoxicitu a virulenci) nebyl pozorován, nicméně při testování kompetiční zdatnosti rodičovský kmen *K. pneumoniae* vždy přerostl transkonjuganta. U *E. coli* však tento jev nebyl pozorován, což vede k hypotéze, že nosičství genu *mcr-1* může mít vliv na fitness specifický pro každý bakteriální druh. Tyto závěry mohou být také vysvětlením, proč je gen *mcr-1* častěji detekován u *E. coli*. Při vnesení genu *mcr-1* pomocí expresního vektoru byla pozorována snížená růstová rychlost, a tedy i vliv na fitness u obou druhů bakterií, což je v souladu s výše uvedenými závěry autorů Yang et al. (Tietgen et al. 2018).

#### 3.2.2.4 Rezervoár genů *mcr* a jejich struktura

Jako hypotetický rezervoár genu *mcr-1* byl navržen rod *Moraxella* spp., který zahrnuje gramnegativní komenzální či patogenní bakterie kolonizující jak zvířata, tak člověka. V rámci *in silico* analýzy v databázi GenBank byla zjištěna 59% a 60% aminokyselinová podobnost proteinů MCR-1 a MCR-2 s MCR-like proteinem nacházejícím se na chromozomu *M. catarrhalis*. Analýza genomů dalších izolátů rodu *Moraxella* metodou celogenomového sekvenování potvrdila výskyt příbuzného genu *mcr* v rámci chromozomální DNA, přičemž podobnost s geny *mcr-1* a *mcr-2* byla přibližně 70 %. Na základě této analýzy byla navržena hypotéza, že masivní používání kolistinu ve veterinářství by mohlo být hlavním faktorem přenosu přirozeně se vyskytující rezistence ke kolistinu u bakterií rodu *Moraxella* na čeleď *Enterobacteriaceae* (Keffer,

Nordmann a Poirel 2017). Jako další pravděpodobní původci byli označeni *Aeromonas* spp. či *Shewanella* spp. (Carattoli et al. 2017; Eichhorn et al. 2018).

Gen *mcr-1* kóduje membránově vázaný enzym složený z pěti hydrofobních transmembránových alfa helixů a solubilní periplazmatické domény. Tento enzym homologní fosfoetanolamin transferázám (Liu et al. 2016) modifikuje fosfát N-acetylglukosaminu na lipidu A fosfoetanolaminem, což kromě rezistence k polymyxinům navíc vede ke snížené stimulaci makrofágů. Autoři Yang et al. pozorovali, že membrána izolátu *E. coli*, který nese gen *mcr-1*, vyvolává nižší produkci interleukinu 6 i faktoru nádorové nekrózy v porovnání s nemodifikovanou membránou (Q. Yang et al. 2017). Mobilizace a celosvětové šíření genu *mcr-1* je umožněno jeho polohou uvnitř kompozitního transpozonu Tn6330 ohraničeného dvěma kopiemi inzerční sekvence *ISAp11*. Transpozon Tn6330 se může nacházet v rámci několika typů plazmidů i na chromozomu. Pravděpodobně došlo nejprve k jeho rozšíření a následné stabilizaci, jejíž příčinou byla ztráta jedné nebo obou inzerčních sekvencí *ISAp11* (Hadjadj et al. 2017; Poirel, Kieffer a Nordmann 2017).

### 3.3 Fenotypová rezistence ke kolistinu

V roce 2016 bylo popsáno, že při testování citlivosti pomocí gradientového difuzního testu (E-test) izolátu *Enterobacter cloacae* izolovaného z transplantovaných ledvin recipienta se sice tvoří inhibiční zóna, nicméně se v inhibiční zóně nachází kolonie rezistentních subpopulací. Tato bakteriální odolnost byla označena jako klonální heterorezistence. Při hlubší analýze bylo zjištěno, že více než 90 % populace vykazující zmíněný fenotyp tvoří buňky citlivé ke kolistinu, které lze eradikovat kolistinem o koncentraci 1 mg/l, naopak rezistentní subpopulace jsou vysoce rezistentní a odolávají dávkám o koncentraci nejméně 500 mg/l. Zmíněný jev nebyl pozorován ani u zcela citlivých (citlivé ke koncentraci 1 mg/l), ani u zcela rezistentních (citlivé k 200 mg/l) kmenů stejné bakterie. Po vystavení kmene obsahujícího rezistentní subpopulace kolistinu vzrostla proporce rezistentních subpopulací až na více než 80 %, což bylo způsobeno selekcí a postupným množením rezistentních bakterií. Jejich následná kultivace v médiu neobsahující kolistin však vedla k navrácení do původního stavu, tedy jejich proporce klesla zpět na cca 10 % (Band et al. 2016). Tyto subpopulace proto nelze označit za perzistory, jelikož perzistentní buňky si zachovávají stále stejnou proporcii v rámci populace a při antibiotické léčbě jejich počet neroste (Balaban et al. 2004). Rozdílnost oproti perzistentním buňkám, které byly ve vzorku taktéž přítomny a které často způsobují rekurenci a chronicitu infekce, spočívá i ve schopnosti rezistentních subpopulací vyvolat akutní infekci končící smrtí hostitele již v průběhu antibiotické léčby. Je také patrné, že příčinou rezistence není stabilní mutace, jelikož se hladina

rezistentních subpopulací při absenci antibiotika brzy vrací na původní hodnotu. Bakterie izolované ze zóny inhibice i mimo ni jsou však identické, což bylo prokázáno sériovou kultivací obou izolátů, kdy kolonie bakterií citlivých i rezistentních vždy narostly do populace obsahující kolonie jak rezistentní, tak citlivé. Jejich identita byla potvrzena i na genetické úrovni opakovanou celogenomovou sekvenací (Band et al. 2016).

Experiment byl taktéž demonstrován *in vivo*. Myši infikované kmenem obsahujícím rezistentní subpopulace byly v jednom případě léčeny kolistinem a ve druhém případě fosfátovým pufrům sloužícím jako placebo. Výsledek experimentu se však lišil od výsledků experimentů provedených *in vitro*. V obou případech došlo k výraznému nárůstu rezistentních subpopulací z původní hodnoty <10 % na hodnotu >80 %. Tento nárůst však nebyl pozorován u myši bez funkčních makrofágů, což ukazuje na významnou roli nespecifické imunity. Další experimenty *in vitro* prokázaly, že důvodem nárůstu rezistentních subpopulací jsou antimikrobiální látky produkované makrofágy, jako jsou kyslíkové radikály, lysozym a myší kationtový antimikrobiální peptid CRAMP (stejně tak i lidský homolog LL-37). Výsledek byl ověřen také *in vivo*, kdy dvojitý mutant myši postrádající lysozym a CRAMP nebo NADPH oxidázu byl sice citlivější k infekci, ale nedošlo u něj k významnému nárůstu rezistentních subpopulací. Při použití E-testu však klinická mikrobiologická pracoviště tyto rezistentní subkultury nemusí zachytit. Výše uvedená studie tak demonstruje použití takové metody pro stanovení citlivosti ke kolistinu, která validním výsledkem umožní citlivější diagnózu klinických izolátů pro nastavení optimální léčby a pro zamezení selhání antibiotické terapie (Band et al. 2016).

Autoři studie dále testovali možnost léčby infekce způsobené tímto kmenem obsahujícím rezistentní subpopulace. Nejprve infikovali myši kmenem citlivým ke kolistinu a kmenem obsahujícím rezistentní subpopulace, které následně léčili vysokými dávkami kolistinu. Léčba myši infikované citlivým kmenem byla úspěšná, naopak léčba myši infikované kmenem obsahujícím rezistentní subpopulace selhala a klinický stav zvířat byl stejný jako u kontrolní skupiny bez léčby. U zvířat s rezistentní subpopulací navíc po 42 hodinách došlo k desetinásobnému nárůstu hladiny bakterií. Pokud však byla léčba kolistinem zahájena současně s infekcí myši (ještě před expanzí rezistentní subpopulace), došlo k patrnému poklesu bakterií v hostiteli stejně jako v případě citlivého kmene (Band et al. 2016).

Na základě RNA sekvenování pro stanovení rozdílů v transkriptomu bylo zjištěno, že rezistentní subpopulace mají v porovnání s citlivými subpopulacemi sníženou expresi 360 genů a u 325 genů je exprese zvýšena, a to včetně dvousložkového systému PhoP/PhoQ, který slouží k úpravě lipidů A. Při testování citlivosti pomocí E-testu mutant

*AphoQ* defektních v senzorické histidinové kináze PhoQ zcela chyběly rezistentní subpopulace. Po provedení komplementační analýzy se rezistentní subpopulace opět objevily (Band et al. 2016).

### 3.4 Epidemiologie výskytu geneticky podmíněné rezistence ke kolistinu

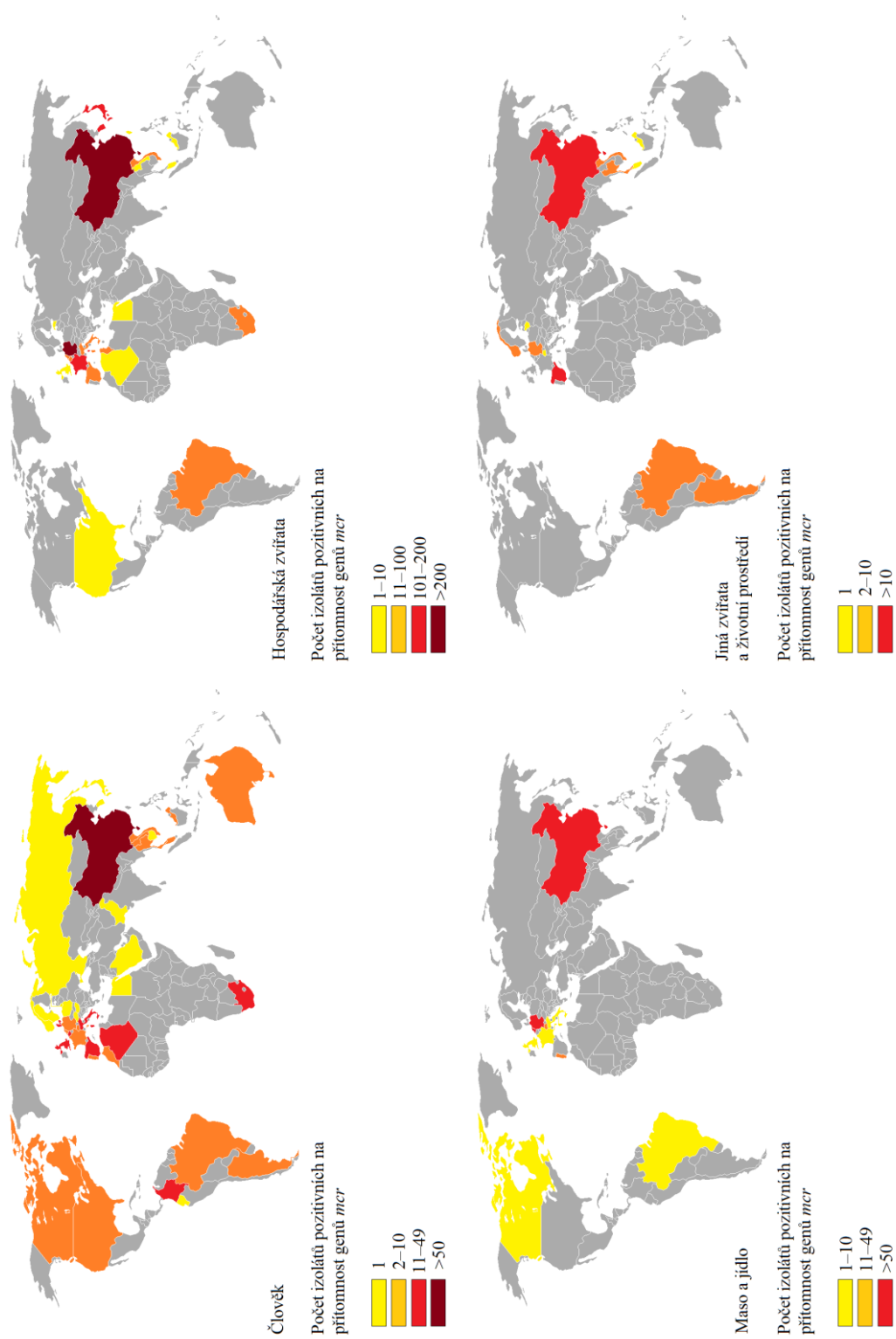
Mutace na chromozomu jsou nejčastějším důvodem bakteriální rezistence ke kolistinu (Aghapour et al. 2019). Plazmidově vázaná rezistence je pak problémem zejména asijských států, kde představuje potenciální zdravotní riziko (Liu et al. 2016), pravděpodobně kvůli masivnímu využívání kolistinu ve veterinářství v Asii, zejména pak v Číně (QYResearch Medical Research Centre 2015). Také v některých evropských státech dochází k nárůstu spotřeby kolistinu, zejména v nemocnicích, kde toto antibiotikum slouží jako rezervní pro léčbu infekcí způsobených multirezistentními gramnegativními bakteriemi, těžkých septických stavů a infekcí u pacientů s indikovanou cystickou fibrózou. V některých evropských státech je však kolistin využíván i v rámci profylaxe nozokomiálních infekcí, což má za následek šíření multirezistentních gramnegativních bakterií z důvodu selekčního tlaku. Přesto však prevalence kolistinové rezistence zůstává v evropských státech relativně nízká (EMA 2016). V následující kapitole se zaměřuji hlavně na studie bezpříznakového nosičství detekující rezistenci ke kolistinu v lidské populaci, potravinách, prostředí a zvířatech.

#### 3.4.1 Geografická distribuce genů *mcr* a jejich šíření

Geny *mcr* byly identifikovány téměř na všech světových kontinentech. Výčet zemí a geografickou distribuci izolátů nesoucích geny *mcr-1* až *mcr-8* shrnují obrázky 4 a 5. Z obrázku 4 je patrné, že geny *mcr* byly detekovány i retrospektivně v bakteriálních sbírkách, jako tomu bylo například u sbírky z 80. let pocházející z kuřecího masa v Číně (Z. Shen et al. 2016), nebo v rámci sbírky z roku 2005 pocházející ze stolice skotu ve Francii (Haenni et al. 2015).

V jedné ze studií zaměřené na šíření genu *mcr-1* bylo studováno vepřové maso z jatek i maloobchodních prodejen v Číně. Autoři studie zjistili každoroční nárůst množství vzorků obsahujících *E. coli* nesoucí gen *mcr-1*. V roce 2012 bylo procentuální zastoupení pozitivních kmenů 14,4 %, v roce 2014 byl pozorován jen mírný nárůst na 14,9 % u jatečného vepřového. V rámci maloobchodních prodejen však činil nárůst o celých 16 % (ze 6,3 % v roce 2011 na 22,3 % v roce 2014). S nižším procentuálním zastoupením byly izolovány pozitivní vzorky i od pacientů, konkrétně z moče, sputa, drenážní a ascitické tekutiny, žluči a rány. Vzhledem k výrazně nižšímu zastoupení pozitivních izolátů pocházejících od lidí ve srovnání se vzorky zvířecími lze usuzovat, že mezi lidskou populací se rezistentní kmeny rozšířily ze zvířecího rezervoáru a vzhledem k variabilitě kontaminovaných vzorků mohou produkty zvířecího původu představovat potenciální zdravotní riziko (Liu et al. 2016).





Obrázek 5: Geografická distribuce izolátů nesoucích geny *mcr*. Převzato z (Nang, Li a Velkov 2019), upraveno.



### 3.4.2 Výskyt u lidí

V České republice byla retrospektivně testována sbírka humánních izolátů rezistentních ke kolistinu izolovaných z různých klinických materiálů v letech 2008 až 2018 Národní referenční laboratoří pro antibiotika (NRL pro ATB). U všech vzorků byla stanovena MIC mikrodiluční metodou a izoláty byly dále testovány na přítomnost genů *mcr-1* až *mcr-5* metodou multiplexové PCR. Celkem bylo na přítomnost genů *mcr* vyšetřeno 610 ke kolistinu rezistentních izolátů (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*). Za období 2008 až 2017 byly zachyceny tři izoláty nesoucí gen *mcr* a pouze ve dvou případech se jednalo o enterobakterie. Jednalo se o kmen *E. cloacae* izolovaný v roce 2014 původem z výtěru z rektu nesoucí gen *mcr-4* (MIC >32 mg/l) a kmen *K. pneumoniae* v roce 2017 izolovaný z moči a nesoucí gen *mcr-1* (MIC 8 mg/l). Ve třetím případě se jednalo o kmen *Acinetobacter baumannii* nesoucí gen *mcr-4*. Za rok 2018 bylo zachyceno sedm izolátů enterobakterií (z celkového počtu 159 rezistentních bakterií za rok 2018) pozitivních na přítomnost genu *mcr-1*. V šesti případech se jednalo o *E. coli*, v jednom případě o *K. pneumoniae*. U všech izolátů byl detekován gen *mcr-1*. Izoláty obsahující mobilní rezistenci ke kolistinu v žádném z případů nebyly rezistentní ke karbapenémům, nicméně u dvou kmenů byla zachycena produkce betalaktamázy, jeden z nich byl pak pozitivní na produkci širokospektré betalaktamázy. Všech sedm izolátů vykazovalo MIC  $\geq 8$  mg/l. Z uvedeného plyne, že počet izolátů s plazmidově vázanou kolistinovou rezistencí v České republice v čase stoupá. Je však nutné dodat, že až do roku 2018 pracovala NRL pro ATB pouze s invazivními klinickými izoláty a až v roce 2018 bylo spektrum rozšířeno také na izoláty nosičské (neinvazivní). Jedná se o významnou limitaci studie, která může vést ke zkresleným výsledkům vývoje rezistence v čase (Pomorská et al. 2018).

Studie zaměřená na prevalenci střevního nosičství bakterií rezistentních ke kolistinu byla provedena taktéž v šesti pařížských nemocnicích, kde byla v roce 2017 analyzována stolice 1217 pacientů. Na základě mikrodiluční metody bylo nalezeno 153 rezistentních izolátů *E. coli* pocházejících od 152 pacientů (12,5 % ze všech vzorků). Nicméně gen *mcr-1* byl potvrzen pouze u sedmi izolátů (4,6 % z rezistentních vzorků) a u 72,6 % zbylých rezistentních izolátů bez výskytu genů *mcr* byla nalezena mutace ve dvousložkovém systému PmrA/PmrB. Zbylé geny *mcr* (*mcr-2* až *mcr-8*) nebyly detekovány u žádného izolátu. Tři ze sedmi izolátů pozitivních na geny *mcr* pocházely od pacientů, kteří byli předchozí rok hospitalizováni v zahraničních nemocnicích (v Thajsku, Kambodži a Jižní Koreji) a u šesti ze sedmi pacientů délka hospitalizace nepřesáhla 48 hodin, což naznačuje komunitní původ infekce. Šest izolátů pak ve svém genomu



neslo další geny rezistence zejména k antibiotikům používaným ve veterinářství (tetracyklin, sulfonamid/trimetoprim a fenikoly), nicméně všechny izoláty byly citlivé ke karbapenemům. To podporuje hypotézu zvířecího rezervoáru mobilní kolistinové rezistence. Tyto výsledky zároveň značí relativně nízký výskyt horizontálně přenosné rezistence ke kolistinu ve srovnání s rezistencí vázanou na chromozom a rizikovým faktorem se zdá být hospitalizace v asijských nemocnicích (Bourrel et al. 2019).

Cestovatelé byli označeni jako riziková skupina pro nosičství multirezistentních kmenů (Bernasconi et al. 2016). Autoři Wintersdorff et al. analyzovali metagenom stolice 122 nizozemských cestovatelů cestujících zejména do Asie a Afriky. I tento výzkum potvrdil sporadický výskyt mobilní kolistinové rezistence. Gen *mcr-1* byl detekován pouze v sedmi izolátech pocházejících od zdravých cestovatelů mezi lety 2010 až 2012, přičemž u jednoho pacienta byl nalezen pozitivní izolát ještě před uskutečněním zahraniční cesty i po jeho návratu. Izoláty byly však na základě Multilocus sequence typing (MLST) analýzy rozdílné a vykazovaly také rozdílnou citlivost k antibiotikům. To značí výskyt a šíření tohoto genu i mezi nizozemskými rezidenty, kteří necestují. Pět ze šesti pacientů pozitivních na přítomnost genu *mcr-1* navštívilo asijské státy, pouze jeden pacient cestoval do Afriky (Wintersdorff et al. 2016).

Ačkoliv je plazmidově vázaná rezistence daleko vyšším rizikem pro šíření, stále zůstává spíše minoritním typem rezistence ke kolistinu. Potvrzuje to například australská studie detekující 96 rezistentních izolátů (z celkového počtu 4555 klinických izolátů spadajících do čeledi *Enterobacteriaceae*) z let 2007–2016, z nichž pouze dva byly pozitivní na přítomnost genu *mcr-1*. V obou případech šlo o *E. coli* dosahující MIC 4 mg/l. Izoláty obsahovaly další geny rezistence a ani v jednom případě nositelé neabsolvovali za posledních pět let zahraniční cestu. Oba izoláty byly citlivé k meropenemu a piperacilinu v kombinaci s tazobaktamem. První izolát pocházející z roku 2011 byl izolován z moči sedmdesátileté pacientky po propuštění z jednotky intenzivní péče, kde nebyla léčena žádným polymyxinovým antibiotikem. V průběhu její hospitalizace nebyl detekován izolát s kolistinovou rezistencí u žádného jiného pacienta, ani žádný pacient nebyl kolistinem léčen. Druhý izolát z roku 2013 pocházel z moči jednasedmdesátileté ženy s diagnostikovaným diabetes mellitus, která byla léčena pro infekci močových cest. Z analýzy plazmidů však i přes značné podobnosti vyplynulo, že jde o dva rozdílné kmeny. Rozdíly spočívaly například v promotorové oblasti genu *mcr-1* a rozdílná byla i Shine-Dalgarno sekvence. Uvedená studie mimo jiné dokazuje nízký výskyt kolistinové rezistence v zemích, ve kterých je kolistin málo používán jak v zemědělství, tak ve zdravotnických zařízeních (Ellem et al. 2017).

### 3.4.3 Potraviny, hospodářská zvířata, prostředí

Ve veterinární medicíně je kolistin velmi hojně používán, zejména u prasat a drůbeže pro prevenci průjmových onemocnění a bakteriemií způsobených *E. coli*, jelikož by taková onemocnění znamenala významnou ekonomickou ztrátu (Kempf et al. 2013). V roce 2012 bylo používání polymyxinů (zejména kolistinu) více než 600× vyšší v zemědělství než v humánní medicíně v rámci 19 evropských zemí (Skov a Monnet 2016). To vedlo ke vzniku hypotézy, že rezervoárem genu *mcr-1*, který se následně rozšířil i mezi lidskou populaci, jsou zvířata chovaná na maso (Liu et al. 2016).

#### 3.4.3.1 Potraviny

Pro zhodnocení výskytu enterobakterií nesoucích mobilní genetickou rezistenci ke kolistinu v potravinách v Dánsku bylo analyzováno kuřecí maso z let 2012 až 2014. Z celkových 380 vzorků bylo nalezeno pět izolátů nesoucích genu *mcr-1*, přičemž ve všech případech šlo o *E. coli* produkující širokospektré betalaktamázy nebo cefalosporinázy bez mutací genů souvisejících s modifikací lipopolysacharidu. Všechny izoláty vykazovaly citlivost ke karbapenémům a žádný z izolátů nepocházel z dánského masa, tedy ve všech případech šlo o importované potraviny. Jeden izolát patřil k sekvenčnímu typu ST131 známému jako původce sepsí a infekcí močového ústrojí u lidí, jehož výskyt bývá u zvířat vzácný (Hasman et al. 2015). Novější analýza z let 2017 až 2018 se zaměřila na krůtí maso vyprodukované v České republice i importované ze zahraničí. Z celkových 17 vzorků masa bylo 12 pozitivních na přítomnost genu *mcr-1*, z toho šest vzorků pocházelo z Polska, tři vzorky z Německa a tři vzorky z České republiky. Následně bylo ve vzorcích identifikováno 42 izolátů nesoucích gen *mcr-1*, konkrétně *E. coli* (n = 39) a *K. pneumoniae* (n = 3). Z uvedeného plyne, že výskyt bakterií nesoucích genu *mcr* v potravinách přestává být výjimkou a může představovat potenciálně rizikový rezervoár mobilní genetické rezistence v populaci (Gelbicova et al. 2019).

#### 3.4.3.2 Hospodářská zvířata

Prevalence kolistinové rezistence byla zjišťována také mezi hospodářskými zvířaty. V rámci francouzské studie bylo analyzováno 1696 izolátů pocházejících ze stolice a céka krocanů, brojlerů a prasat z let 2007 až 2014. Celkem 23 izolátů dosahovalo MIC >2 mg/l a ve všech byl detekován gen *mcr-1* metodou cílově specifické PCR. Ve všech případech šlo o komenzální izolát *E. coli*. Dva izoláty pocházely ze zdravých prasat, sedm z brojlerů a 14 izolátů bylo izolováno z krocanů, přičemž ve většině případů šlo o izoláty pocházející z let 2013 a 2014 (pouze jeden izolát pocházel z roku 2011). Častá byla i korezistence k dalším typům antibiotik jako je ampicilin, tetracyklin, chinolony, sulfametoxazol a trimetoprim, což může představovat výhodu pro šíření kmenů

rezistentních ke kolistinu. Z uvedeného vyplývá, že nejvyšší prevalence nosičství genu *mcr-1* bylo dosaženo u krocanů a nejnižší pak u prasat a procentuální výskyt genu *mcr-1* se v průběhu času zvyšoval, což naznačuje šíření genu *mcr-1* mezi hospodářskými zvířaty ve Francii. Lze také pozorovat výrazně vyšší zastoupení mobilní kolistinové rezistence oproti chromozomálně vázané, což je opačný stav, než je tomu u lidské populace (Perrin-Guyomard et al. 2016).

Nosičství genu *mcr-1* je často pozorováno u pacientů pracujících se zvířaty. Čínská studie z roku 2017 zkoumající ke kolistinu rezistentní klinické izoláty *E. coli* s genem *mcr-1* a bez genu *mcr-1* izolovaných z více kohort obyvatelstva ukazuje, že více než polovina izolátů pozitivních na přítomnost genu *mcr-1* byla izolována ze vzorků od farmářů. Vzhledem k nízkému předepisování kolistinu v čínském zdravotnictví, ale naopak vysokému užívání kolistinu v zemědělství, se zdá pravděpodobné, že selekčním tlakem vedoucím k vysokému zastoupení izolátů nesoucích geny *mcr* je užívání kolistinu. Přenos izolátů pozitivních na přítomnost genů *mcr* ze zvířat na člověka tedy může být způsoben právě prostřednictvím farmářů, kteří před zákazem užívání kolistinu jako růstového faktoru doplňovali krmivo kolistinem za účelem zvýšení přírůstku hmotnosti. Vzhledem k nízkému užívání kolistinu v humánní medicíně neexistuje ani selekční tlak, tudíž je rezistence ke kolistinu pozorována zřídka a spíše ve formě náhodných chromozomálních mutací (Luo et al. 2017). Vysvětlením může být expozice bakterií velkému množství léčiv, která se neřadí mezi antibiotika. Příkladem je expozice bakterií chlorhexidinu, která může vést k postupné adaptaci k tomuto antiseptiku prostřednictvím změny exprese genů *pmrD*, *phoPQ* a *pmrK*. Mechanizmy uvedenými v kapitolách 3.2.1.1 a 3.2.1.2 pak dochází také ke zkřížené rezistenci ke kolistinu (Wand et al. 2016).

Rezistence k antibiotikům může být zkřížená také s odolností k jiným typům léčiv, která jsou primárně cílená na lidské, a nikoli bakteriální buňky (např. antimetabolity používané jako chemoterapeutika a imunosupresiva či antipsychotika), jelikož cíle těchto léčiv jsou konzervované také v bakteriích. Zmíněný jev byl pozorován u delečního mutanta v genu pro efluxní pumpu *tolC* u izolátu *E. coli*. Takový mutant byl citlivější nejen k antibiotikům, ale také k léčivům primárně cílícím na lidské buňky. Expozicí těmto léčivům tedy může také docházet k selekci mutantů rezistentních k antibiotikům (Maier et al. 2018). Antibiotická rezistence se pak může náhodně objevit i u bakterií, které danému antibiotiku nikdy nebyly vystaveny, a to například navozením teplotního šoku či limitací glukózou. Modifikací RNA polymerázy po vystavení stresu dochází ke změnám terminace a účinnosti transkripce, a tedy i ke změnám genové exprese, což následně může vést k antibiotické rezistenci (Rodríguez-Verdugo, Gaut a Tenaillon 2013). Všechny zmíněné studie mohou být vysvětlením, proč u lidí nacházíme častěji chromozomálně

vázanou rezistenci ke kolistinu, nicméně pro plné pochopení tohoto jevu je třeba další výzkum.

Další studie zaměřená na prevalenci genu *mcr-1* byla provedena v Německu. Autoři studie analyzovali 577 celogenomových sekvencí izolátů pocházejících od zvířat, lidí a životního prostředí. Gen *mcr-1* byl detekován u čtyř izolátů *E. coli* izolovaných z německých prasat (z celkového počtu pěti pozitivních izolátů, přičemž pátý izolát byl humánního původu a pocházel ze stěru z rány). MIC se u izolátů z prasat pohybovala v rozmezí od 2 do 16 mg/l a všechny bakteriální izoláty navíc produkovaly širokospektré betalaktamázy nebo karbapenemázy. Jelikož se gen *mcr-1* vyskytoval na různých typech plazmidů, je zřejmý jeho potenciál pro šíření horizontálním genovým transferem (Falgenhauer et al. 2016).

#### 3.4.3.3 Životní prostředí

Švýcarská studie poukázala také na výskyt genů *mcr* v životním prostředí. Ze 74 izolátů enterobakterií produkujících širokospektré betalaktamázy izolovaných z 21 švýcarských řek a jezer v roce 2012 byl nalezen jeden kmen *E. coli* pozitivní na přítomnost genu *mcr-1*. Ačkoliv je číslo relativně nízké, výskyt rezistentních koliformních bakterií ve vodě značí její znečištění a měl by vést k zavádění účinnějších mechanismů čištění odpadních vod, aby nedocházelo k uvolňování rezistentních bakterií do životního prostředí (Zurhuh et al. 2016). Podobná studie byla provedena i ve Španělsku, kde bylo testováno 195 izolátů enterobakterií z barcelonských čističek odpadních vod a španělských řek. Ačkoliv nebyl nalezen žádný kmen nesoucí plazmidově vázanou rezistenci ke kolistinu ve vodě z řek, v čističkách odpadních vod bylo detekováno 29 izolátů *E. coli* a jeden izolát *K. pneumoniae* nesoucí gen *mcr-1*. Tato data naznačují vysoký výskyt kolistinové rezistence u barcelonských rezidentů (Ovejero et al. 2017). Výsledky španělské studie jsou značně alarmující zejména z důvodu snadného přenosu antibiotické rezistence mezi různými bakteriálními druhy ve vodním prostředí, které představuje ideální místo pro zisk a šíření mobilních genetických elementů zejména z důvodů antropogenního vlivu na vodní prostředí (Taylor, Verner-Jeffreys a Baker-Austin 2011). Ten zahrnuje odtok zemědělských vod a odpadních vod z domácností a nemocnic (Baquero, Martínez a Cantón 2008).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Materiál

V rámci grantu, během kterého vznikla také tato diplomová práce, byly pro zmapování výskytu kolistinové rezistence se zaměřením na plazmidově kódované geny rezistence (*mcr-1* až *mcr-9*) vyšetřovány následující typy vzorků.

#### 4.1.1 Prospektivní studie – střevní nosičství v nemocničním prostředí

Pro prospektivní studii zaměřenou na bezpříznakové nocičství byly vyšetřovány humánní vzorky (stolice a rektální výtěry) od pacientů hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici v Motole, jejich kontaktů a zdravotnického personálu. Cílem bylo zmapovat nocičství enterobakterií rezistentních ke kolistinu, které nesou geny *mcr* v nemocničním prostředí.

#### 4.1.2 Prospektivní studie – střevní nocičství u zdravé populace s cestovatelskou anamnézou

Cestovatelé, zejména ti vracející se ze zemí s vysokým výskytem plazmidově vázané kolistinové rezistence jako je Čína a státy jihovýchodní Asie, jsou rizikovou skupinou kvůli možnosti importu enterobakterií nesoucích geny *mcr* ze zahraničí, čímž se z nich stává potenciální zdroj šíření kolistinové rezistence. Proto byly zahrnuty do prospektivní studie bezpříznakového nocičství také vzorky od cestovatelů vracejících se ze zahraničí, či od cizinců dočasně žijících v České republice, kteří navštěvují Centrum cestovní medicíny v Nemocnici Na Bulovce.

#### 4.1.3 Prospektivní studie – klinické izoláty s prokázanou rezistencí ke kolistinu

Do studie byly zařazeny také klinické bakteriální izoláty rezistentní ke kolistinu kultivované z různých materiálů (např. sputum, moč, hemokultura, výtěr z rektu atd.) s cílem zjistit mechanismus rezistence ke kolistinu. Tyto vzorky byly získány rutinní mikrobiologickou diagnostikou na Ústavu lékařské mikrobiologie Fakultní nemocnice v Motole a/nebo zaslány z externích pracovišť.

#### 4.1.4 Sběrka klinických izolátů *Enterobacteriaceae*

Pro retrospektivní studii byla použita sbírka klinických izolátů infekčního původu (2011–2017) izolovaných od pacientů z Fakultní nemocnice v Motole s cílem zmapování výskytu plazmidově vázané rezistence ke kolistinu v čase. Bakteriální izoláty z této sbírky byly archivovány z důvodu jejich vyšetřování na produkci širokospektrých betalaktamáz a/nebo karbapenemáz.

#### 4.1.5 Primery pro PCR

Seznam oligonukleotidů použitých pro kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci (qPCR) je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2: Seznam primerů pro PCR.

Multi plex	Cílový gen	Název oligonukleotidu	Interní označení primeru	Sekvence 5'-3'	Velikost produktu (bp)	Reference
1	<i>mcr-1</i>	CLR5-R	178	CGGTCAGTCCGTTT GTTC	309	(Liu et al. 2016)
		CLR5-F	179	CTTGGTCGGTCTGT AGGG		
	<i>mcr-2</i>	MCR2-IR-F	182	TGTTGCTTGTGCCG ATTGGA	567	(Xavier et al. 2016)
		MCR2-IR-R	183	AGATGGTATTGTTG GTTGCTG		
	<i>mcr-3</i>	MCR3-F	184	TTGGCACTGTATTTT GCATTT	542	(Yin et al. 2017)
		MCR3-R	185	TTAACGAAATTGGC TGGAACA		
	<i>mcr-4</i>	MCR4-F	194	ATTGGGATAGTCGC CTTTTT	487	(Carattoli et al. 2017)
		MCR4-R	195	TTACAGCCAGAATC ATTATCA		
	<i>mcr-5</i>	MCR5-F-int	196	TATCTCGACAAGGC CATGCTG	613	(Borowiak et al. 2017)
		MCR5-R-int	197	GAATCTGGCGTTCG TCGTAGT		
2	<i>mcr-6</i>	mcr_6_F	208	TGCTCTATGTCAGC GACCAC	228	Tato studie
		mcr_6_R	209	TGCGGTCTTTGACCT TATCC		
	<i>mcr-7</i>	mcr_7.1_F	210	AGGGGATAAACCGA CCCTGA	335	(Y. Yang et al. 2018)
		mcr_7.1_R	211	TGATCTCGATGTTG GGCACC		
	<i>mcr-8</i>	MCR_8F	214	AACCGCCAGAGCAC AGAATT	667	(X. Wang et al. 2018)
		MCR_8R	215	TTCCCCCAGCGATT TCCAT		
3	<i>mcr-9</i>	MCR_9F	220	CGGTACCGCTACCG CAATAT	131	(Kieffer et al. 2019)
		MCR_9R	221	ATAACAGCGAGACA CCGGTT		

#### 4.1.6 Chemikálie a kity

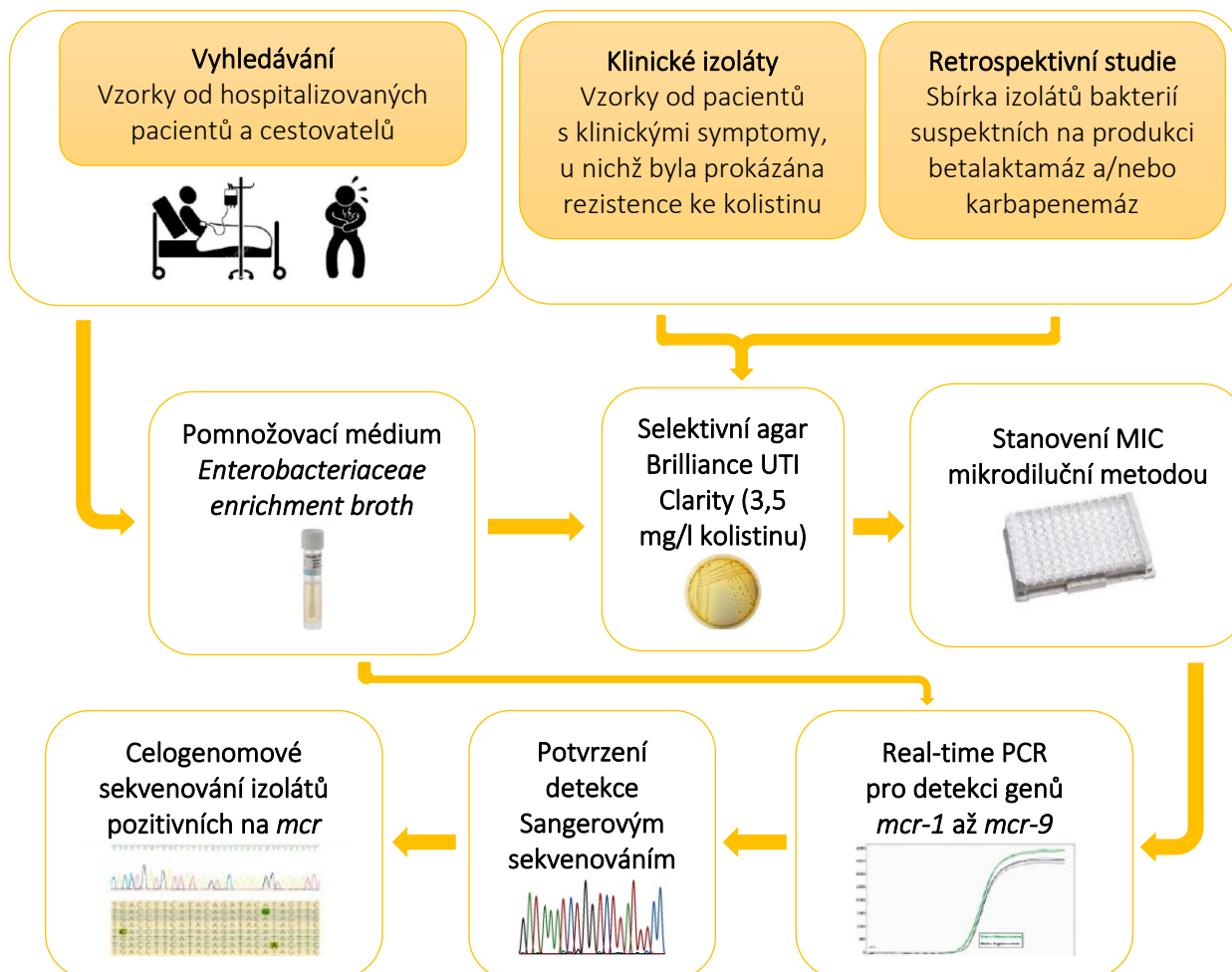
Chemikálie a kity použité při experimentech uskutečněných v rámci diplomové práce jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Seznam názvů a výrobců použitých chemikálií a kitů

Název	Výrobce
QuantiTect SYBR® Green PCR Kit	© QIAGEN
DNeasy® Blood & Tissue Kit	© QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	© QIAGEN
AMPure XP	Beckman Coulter
Agencourt® CleanSEQ	Beckman Coulter
Nextera XT DNA Library Preparation Kit	Illumina®
High-Sensitivity DNA Library Preparation Kit	Illumina®
Set pro stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotik (G-I a G-II)	MIKROLATEST®, Erba Lachema s. r. o.
Set pro stanovení minimální inhibiční koncentrace kolistinu	MIKROLATEST®, Erba Lachema s. r. o.
Suspenzní médium pro MIC	MIKROLATEST®, Erba Lachema s. r. o.
Luria-Bertani Medium	Sigma Life Science, Sigma-Aldrich®
Kolistin sulfát	Sigma Life Science, Sigma-Aldrich®
ChargeSwitch® gDNA Mini Bacteria Kit	Thermo Fisher Scientific
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
BigDye® Direct Sanger Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific
Pozitivní kontroly pro <i>mcr-1</i> až <i>mcr-9</i>	Thermo Fisher Scientific GeneArt String
Brilliance UTI Clarity agar	Thermo Fisher Scientific Oxoid Ltd
<i>Enterobacteriaceae</i> enrichment broth	Thermo Fisher Scientific Oxoid Ltd

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Schéma průběhu experimentální části práce

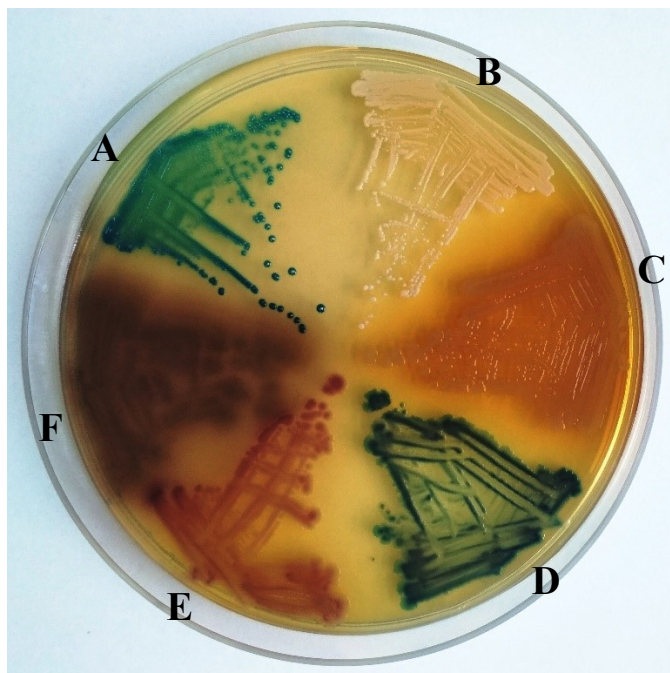


### 4.2.2 Pomnožení a selektivní kultivace

V rámci prospektivní studie byly výtěry z rektu nebo stolice (viz kap. 4.1.1 a 4.1.2) inokulovány do pomnožovacího média *Enterobacteriaceae enrichment broth* a kultivovány přes noc při 37 °C. Pomnožené bakteriální kultury byly naočkovány sterilním tamponem na selektivní médium Brilliance UTI Clarity agar s přidavkem kolistin sulfátu v koncentraci 3,5 mg/l a opět kultivovány přes noc při 37 °C. Selektivní půda Brilliance UTI Clarity agar obohacená o kolistin sulfát v koncentraci 3,5 mg/l byla také používána pro kultivaci klinických izolátů (viz kap. 4.1.3).

Bakteriální sbírkové izoláty použité pro retrospektivní studii (viz kap. 4.1.4) byly vyočkovány na chromogenní Brilliance UTI Clarity agar bez přidavku kolistin sulfátu a taktéž kultivovány přes noc v termostatu při teplotě 37 °C. Kultivace na chromogenním substrátu umožňuje barevné rozlišení bakteriálních kolonií různých druhů, což lze vidět na obrázku 6.





Obrázek 6: Selektivní Brilliance UTI Clarity agar obohacený o kolistin s koloniemi následujících rodů: A – *Enterococcus*, B – koaguláza negativní stafylokoky, C – *Proteus*, D – *Enterobacter*, E – *Escherichia*, F – *Pseudomonas*.

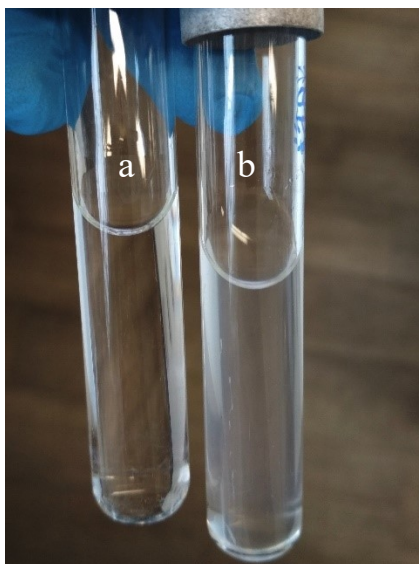
#### 4.2.3 Druhová identifikace

Na selektivním médiu vyrostlé bakteriální kolonie fenotypově odpovídající enterobakteriím (barva a tvar kolonií) byly druhově identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight, Bruker Daltonics (MALDI-TOF) a skóre  $\geq 2,0$  bylo považováno za dostatečné pro spolehlivé určení druhu. Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF poskytuje spolehlivé určení bakteriálního druhu na základě určení hmotnostního spektra izolátu. Po vystavení vzorku bakteriální biomasy (smíchané s vhodnou matricí) laserovému záření a po následné ionizaci jsou získány ionty peptidů analyzovaného kmene. Ionty jsou urychleny magnetickým polem a putují do detektoru, kde se na základě jejich rychlosti, která je úměrná jejich hmotnosti a náboji, určí hmotnostní spektrum izolátu. Spektrum je následně porovnáváno s databází MALDI Biotyper 3.1 (<http://umtk.vscht.cz/miniatlas-vad/metody/maldi-tof-ms/>, ke dni 20. července 2020).

#### 4.2.4 Testování citlivosti ke kolistinu mikrodiluční metodou

Pro potvrzení rezistence ke kolistinu, stanovení rezistence k dalším antibiotikům a za účelem určení přesné MIC, tedy nejnižší koncentrace bránící viditelnému růstu bakterií, byly bakteriální izoláty získané ze vzorků uvedených v kapitolách 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3 a 4.1.4 testovány mikrodiluční metodou (komerční kit pro stanovení MIC kolistinu a sady dalších antibiotik G-I a G-II). Nejdříve byla připravena bakteriální suspenze. Do zkumavky s 2 ml sterilního fyziologického roztoku bylo inokulační kličkou přeneseno několik kolonií z čisté bakteriální kultury a zákal suspenze byl upraven

na 0,5 McFarlanda (znázorněno na obrázku 7, odpovídá přibližně hodnotě  $OD_{600} = 0,1$ , tedy  $8 \times 10^7$  buněk/ml pro *E. coli*). Poté bylo přeneseno 60  $\mu$ l bakteriální suspenze o připravené koncentraci do zkumavky s 13 ml suspenzního média a následně promícháno. Takto připravená bakteriální suspenze byla vždy po 100  $\mu$ l inokulována do každé z osmi jamek stripu a do dvou mikrotitračních destiček se sadou antibiotik (G-I a G-II) obsahující lyofilizovaná antibiotika. Nainokulované stripy byly vloženy do rámečku a stejně jako mikrotitrační destičky se sadou antibiotik uzavřeny do PE sáčku pro zabránění odpaření média a inkubovány přes noc při teplotě 37 °C. Jako rezistentní ke kolistinu byl považován izolát s MIC >2 mg/l, pro další antibiotika byly použity hodnoty stanovené organizací EUCAST nebo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). EUCAST v dokumentu Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (verze 10.0) uvádí hraniční hodnoty pro většinu testovaných antibiotik (EUCAST 2019). Hodnoty, které EUCAST nedefinuje, byly převzaty od institutu CLSI dle pokynů uvedených v manuálu sady pro testování MIC.



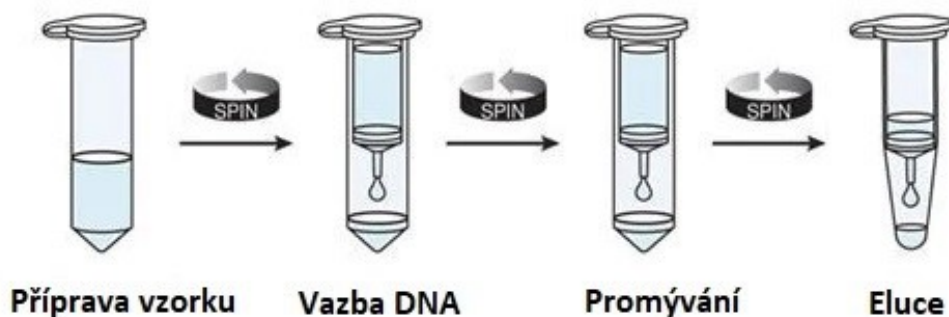
Obrázek 7: Zkumavky obsahující čistý fyziologický roztok (a) a bakteriální suspenzi o zákalu 0,5 McFarlanda (b).

#### 4.2.5 Izolace DNA

DNA byla izolována z pomnožené bakteriální kultury ze vzorků popsanych v kapitolách 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3 a 4.1.4 pro zvýšení zachytu genů *mcr* v případě negativní selektivní kultivace. Pro izolaci DNA byl použit DNeasy® Blood & Tissue Kit. Princip izolace je schematicky znázorněný na obrázku 8. Jedná se o selektivní vazbu DNA na DNeasy membránu, zatímco kontaminanty jsou uvolněny do eluátu. Po přidání elučního pufru je DNA z membrány uvolněna.

Nejdříve byl vzorek lyzován za použití lyzačních pufrů ATL a AL, proteinázy K a 96% etanolu. Poté byla do nové zkumavky vložena DNeasy membrána a na ni nanesena získaná suspenze. Následně byl vzorek za použití promývacích pufrů

AW1 a AW2 zbaven nukleoproteinů a nukleolytických enzymů a centrifugován až do vysušení DNeasy membrány, což je důležité pro zabránění interference etanolu s následujícími reakcemi. Po přidání elučního pufru AE byla čistá DNA uvolněna do supernatantu. Podrobný postup je popsán v návodu příslušného kitu.



Obrázek 8: Postup izolace DNA pomocí ® Blood & Tissue Kitu. Po přípravě vzorku je suspenze nanášena na DNeasy membránu, na kterou se naváže DNA ze vzorku, poté dojde k několika promytím, a nakonec je DNA pomocí elučního pufru uvolněna do mikrozkušavky.

Podobným způsobem se pracovalo i s izoláty narostlými na selektivním chromogenním agaru. Inokulační kličkou bylo několik kolonií z čisté kultury přeneseno do 1 ml fyziologického roztoku v mikrozkušavce a následující postup byl totožný s postupem popsáním výše.

#### 4.2.6 qPCR amplifikace

Pro detekci přítomnosti genů *mcr* ve vzorcích DNA byla prováděna polymerázová řetězová reakce v reálném čase s detekcí amplifikace pomocí DNA vazebného barviva SYBR Green s následnou analýzou křivky tání pro detekci jednotlivých variant genů *mcr*. Pro polymerázovou řetězovou reakci byl použit termocykler Biorad CFX96. Pro detekci genů *mcr-1* až *mcr-9* byly připraveny dva multiplexní reakční mixy a jeden monoplexní reakční mix, a to následujícím způsobem. Do sterilních mikrozkušavek byl po důkladném promíchání a krátké centrifugaci napipetován PCR mastermix QuantiTect SYBR Green PCR Kit, do kterého byly přidány forward i reverse primery pro geny *mcr-1* až *mcr-5* popsané výše a vše bylo doplněno vodou. Stejným způsobem byl připraven i mastermix s primery pro geny *mcr-6* až *mcr-8* a mastermix s primery pro gen *mcr-9*. Množství přidávaných složek je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4: Množství přidávaných složek do připravovaného mastermixu.

Přidaná složka	Objem/vzorek (μl)
2x QuantiTect PCR Master Mix	10
Primer forward	0,75
Primer reverse	0,75
Templátová DNA	2
PCR voda	Doplnit do 20

Mastermixy byly důkladně promíchány a krátce zcentrifugovány. Do mikrozkušavek o objemu 0,2 ml bylo napipetováno 18 µl prvního reakčního mixu a 2 µl vzorku DNA, stejný postup byl aplikován i pro druhý a třetí reakční mix. Mikrozkušavky byly vloženy do termocykleru a byl spuštěn příslušný protokol (viz tabulka 5). Během PCR reakce zoptimalizované na multiplex formát se při každém cyklu reakce odečítá fluorescenční signál, jehož nárůst indikuje amplifikaci cílového úseku DNA. Pro odlišení jednotlivých genů *mcr* následovala po skončení PCR reakce analýza křivek tání, které byly porovnány s pozitivními kontrolami pro tyto geny. Při pozitivitě u vzorku bylo provedeno Sangerovo sekvenování produktu s primery pro příslušný gen identifikovaný podle křivky tání. Podmínky pro PCR reakci pro detekci genů *mcr-1* až *mcr-8* jsou popsány v tabulce 5.

Tabulka 5: Podmínky PCR pro detekci genů *mcr-1* až *mcr-8*.

Teplota	Doba trvání	Počet opakování
96 °C	15 minut	1
96 °C	60 sekund	35
60 °C	90 sekund	
72 °C	60 sekund	
72 °C	10 minut	1

V průběhu řešení diplomové práce byl v odborné literatuře popsán další gen *mcr-9* (Kieffer et al. 2019), proto byla provedena retrospektivní analýza sbírky izolátů popsané v kapitole 4.1.4 na přítomnost tohoto genu. Byla provedena singleplexová polymerázová řetězová reakce a byl aplikován postup popsáný výše s upraveným postupem při PCR. Podmínky PCR reakce pro detekci genu *mcr-9* jsou popsány v tabulce 6.

Tabulka 6: Podmínky PCR pro detekci genu *mcr-9*.

Teplota	Doba trvání	Počet opakování
96 °C	15 minut	1
96 °C	60 sekund	35
58 °C	90 sekund	
72 °C	60 sekund	
72 °C	10 minut	1

#### 4.2.7 Sangerovo sekvenování

Pro confirmaci přítomnosti genů *mcr* prokázaných pomocí qPCR bylo použito Sangerovo sekvenování pomocí kapilární elektroforézy.

Před použitím PCR produktu do sekvenační reakce je nutné PCR produkt přechistit. Pro přechistění byla použita souprava QIAquick PCR Purification Kit, která obsahuje křemičitou membránu pro navázání DNA ve vysokosolném pufru, zatímco kontaminanty prochází do eluátu. DNA je následně eluována v nízkosolném pufru nebo vodě. Purifikace zahrnuje odstranění primerů, nukleotidů, enzymů, minerálních látek, solí, agarózy, etidium bromidu a dalších nečistot ze vzorku. Specializované vazebné pufrы jsou optimalizovány pro selektivní adsorpci molekul DNA. Nejdříve byl k PCR produktu přidán pufr PB pro zajištění optimální hodnoty pH, která umožní efektivní vazbu DNA k membráně. Po umístění membrány do nové zkumavky byl na membránu nanesen PCR produkt smíchaný s pufrem. Pro promytí byl přidán promývací pufr PE a následně byl na membránu aplikován eluční pufr EB nebo voda pro uvolnění DNA do eluátu. Přesný postup je k dispozici v návodu kitu.

Následovala sekvenační reakce za použití soupravy BigDye® Direct Sanger Sequencing Kit. Přechistěný PCR produkt byl napipetován do mikrotitrační destičky a do jedné jamky byl přidán reakční mix obsahující forward primer, do druhé jamky byl přidán reakční mix obsahující reverse primer komplementární genu, který měl být sekvenován. Poté byla spuštěna sekvenační reakce v termocykleru dle protokolu uvedeného v tabulce 7.

Tabulka 7: Podmínky PCR pro sekvenační reakci.

Teplota	Doba trvání	Počet opakování
96 °C	3 minuty	1
96 °C	10 sekund	30
50 °C	5 sekund	
60 °C	2 minuty	

Po proběhnutí sekvenační reakce bylo nutné PCR produkt opět přechistit pro odstranění kontaminantů jako jsou dNTP, soli, primery a primerové dimery. K tomu byla použita souprava Agencourt® CleanSEQ využívající magnetické kuličky, na které se váže DNA a kontaminanty jsou uvolněny do eluátu. Po promytí magnetických kuliček 85% etanolem byla DNA uvolněna do eluátu. Podrobnější popis je popsán v návodu soupravy.

Pro separaci a vizualizaci sekvenační reakce byl přechistěný produkt vložen do přístroje ABI 3130xl Genetic Analyzer a byla spuštěna kapilární elektroforéza. Metoda kapilární elektroforézy umožňuje provést sekvenování v jedné zkumavce, ve které se nachází všechny čtyři terminační dideoxynukleotidy značené různými fluorescenčními barvivy, z nichž každá emituje světlo o různé vlnové délce. Kapilární

elektroforéza využívá principu migrace negativně nabitých fragmentů DNA k pozitivně nabitě anodě, přičemž kratší fragmenty putují elektrickým polem rychleji. Fluorescenčně značené dideoxynukleotidy jsou při průchodu kapilárou snímány detektorem a vyhodnocovány.

#### 4.2.8 Celogenomová sekvenace

Izoláty nesoucí kolistinovou rezistenci na plazmidu prokázanou v rámci prospektivního testování pomocí PCR detekce s potvrzením pomocí Sangerova sekvenování byly charakterizovány prostřednictvím sekvenování celého genomu na platformě Illumina.

##### 4.2.8.1 Izolace DNA

DNA byla izolována za použití ChargeSwitch® gDNA Mini Bacteria Kitu. Nejprve byla rozmíchána RNáza A v resuspenzním pufru a pro lýzi buněčných stěn byl přidán čerstvý lysozym. Po přidání jedné bakteriální kolonie a následné krátké inkubaci byl přidán lyzační pufr a proteináza K. Následovala další inkubace, po níž byly do směsi přidány magnetické kuličky ChargeSwitch® a vazebný pufr, který zajistil snížení pH umožňující vazbu DNA na pozitivně nabitě magnetické kuličky. Taková suspenze byla několikrát umístěna na magnetický stojan, kde došlo k vytvoření peletu, a DNA byla promyta promývacími pufrů. Pro uvolnění DNA byl použit eluční pufr. Po umístění mikrozkuhavky na magnetický stojan byla DNA uvolněna do supernatantu. Podrobnější postup je přiložen u příslušného kitu.

##### 4.2.8.2 Kontrola množství DNA

Množství DNA připravené pro celogenomovou sekvenaci bylo ověřeno pomocí soupravy Qubit™ dsDNA HS Assay Kit s následným čtením koncentrace na přístroji Qubit® Fluorometer. Měření koncentrace DNA probíhá na základě detekce fluorescenčních barviv, která se uvolní po vazbě na cílovou molekulu. Podrobnější postup je popsán v návodu výše zmíněného kitu.

Připravená DNA byla následně použita pro přípravu knihovny pro sekvenování pomocí platformy Illumina a zároveň byla vybraná DNA zaslána do laboratoře spoluřešitelského pracoviště grantu (Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně) pro nanopórové sekvenování (MinION), jehož výsledkem byla dlouhá čtení.

##### 4.2.8.3 Příprava knihoven

Knihovna DNA fragmentů byla připravena pomocí soupravy Nextera XT DNA Library Preparation Kit. Nejprve byla DNA určena k celogenomovému sekvenování fragmentována a na fragmenty byly připojeny adaptorové sekvenace prostřednictvím značených transpozonů. K tomu byla použita amplikonová značící směs a značící a neutralizační pufr v přístroji termocykler pro připojení adaptorů na DNA. Poté došlo



k amplifikaci označené DNA v termocykleru pro přidání indexových adaptorů a sekvencí nutných pro tvorbu klastrů za použití Nextera PCR Master Mixu. Tímto krokem vznikly fragmenty připravené pro celogenomovou sekvenaci. Následovalo přečištění knihovny za použití Agencourt AMPure XP kuliček, na které se navázala DNA, a poté byly kuličky promyty pomocí 80% etanolu. DNA byla uvolněna do resuspenzního pufru. Poté byla ověřena kvalita vytvořené DNA knihovny na přístroji Agilent Technology 2100 Bioanalyzer za použití soupravy High-Sensitivity DNA Library Preparation Kit. Následně byla DNA zaslána do externí laboratoře Macrogen, Inc. v Jižní Koreji, kde proběhla sekvenace na platformě Illumina, MiSeq. Výsledkem byla krátká čtení, která byla dále zpracovávána pomocí bioinformatických metod.

#### 4.2.9 Bioinformatické metody

Pro *de novo* assembly z krátkých čtení (data ve formátu FASTQ) byl využit software SPAdes (Antipov et al. 2016). Získané kontigy byly použity pro určení sekvenčního typu metodou core genome MLST (cgMLST) a sekvenčního typu dle Achtmannova MLST schématu a dle Pasteurova institutu (cgST), detekci genů pro rezistenci (získaných i chromozomálních mutací) a identifikaci plazmidů. K analýze byly použity následující softwarové nástroje. Pro určení sekvenčního typu (ST) a k určení klonální linie byly kontigy charakterizovány za použití databáze MLST 2.0. K identifikaci přítomných genů rezistence a mutací souvisejících s rezistencí byla využita databáze ResFinder 3.2 a pro klasifikaci bakteriálních plazmidů byl využit nástroj PlasmidFinder 2.1. Výše uvedené bioinformatické nástroje jsou dostupné na webových stránkách Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org>). Pro rozlišení chromozomálně vázané a plazmidově vázané rezistence ke kolistinu mediované geny *mcr* bylo *de novo* assembly z krátkých čtení provedeno pomocí softwaru plasmidSPAdes, který vychytává sekvence plazmidů a odlišuje je od sekvencí chromozomálních (Antipov et al. 2016). Pro přesnější sestavení sekvence u vzorků popsanych v kapitolách 4.1.1 a 4.1.2 byla dlouhá čtení (získaná nanopórovým sekvenováním) porovnána s krátkými čteními v programu Unicycler v0.4.7 (Wick et al. 2017).

#### 4.2.10 Test indukce rezistence ke kolistinu

Vzhledem k tomu, že u izolátů s geny *mcr-9* byla popsána inducibilita kolistinové rezistence, byly izoláty nesoucí tento gen a náhodně vybrané kontrolní izoláty bez genu *mcr-9* otestovány, zda je u nich možné vystavením nízkým dávkám kolistinu indukovat rezistenci. Byla využita metodika popsaná v článku autorů Kieffer et al. (Kieffer et al. 2019), která byla modifikována následujícím způsobem.

Nejdříve byly testované izoláty vyočkovány na krevní agar, po confirmaci druhu pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF byla z narostlých kolonií izolována DNA výše uvedeným způsobem a provedena PCR analýza pro potvrzení přítomnosti genu *mcr-9*. Poté byl připraven zásobní roztok kolistin sulfátu o koncentraci 1 mg/ml. Dále byly pro každý testovaný izolát připraveny čtyři kónické zkumavky o objemu 15 ml obsahující 5 ml předem připraveného a vysterilizovaného média Luria-Bertani (LB). Každý testovaný kmen byl vystaven třem různým koncentracím kolistin sulfátu, a to 0,25 mg/l, 0,5 mg/l a 1 mg/l, tedy koncentracím blízkým minimální inhibiční koncentraci testovaných kmenů. Poslední zkumavka neobsahovala kolistin sulfát a sloužila jako kontrola. Kmeny vyrostlé na krevním agaru byly rozmíchány ve 2 ml fyziologického roztoku na hustotu 0,5 McFarland. Poté 100 µl každého kmene rozmíchaného ve fyziologickém roztoku bylo napipetováno do všech čtyř kónických zkumavek, vždy do tří s přidavkem kolistin sulfátu o různé koncentraci a do jedné bez něj sloužící jako kontrola. Zkumavky s testovanými kmeny byly přes noc inkubovány při 37 °C a aeraci 200 otáček za minutu.

Následujícího dne byly všechny zkumavky vloženy do centrifugy a stočeny pět minut při 14 000 otáčkách, následně byl odlit supernatant. Kmeny schopné růstu za přítomnosti kolistin sulfátu (viditelný zákal média před centrifugací) byly pomocí vatového tamponu rozmíchány ve 2 ml fyziologického roztoku na hustotu 0,5 McFarland a byla u nich provedena mikrodiluční metoda pro stanovení MIC kolistinu. Pro testování MIC byla vždy použita kultura ze zkumavky obsahující nejvyšší koncentraci kolistin sulfátu, ve které byl patrný zákal. MIC byla stejným způsobem testována také u bakteriální kultury vyrostlé v kontrolní zkumavce bez kolistinu. Kmeny neschopné růstu za přítomnosti kolistin sulfátu o jakékoliv koncentraci byly označeny za citlivé a nebylo s nimi dále manipulováno.

#### 4.2.11 Stanovení růstové rychlosti

Pro charakterizaci fyziologie bakterií nesoucích geny *mcr* byla stanovena růstová rychlost vybraných izolátů. Izoláty uchované při -80 °C byly naočkovány na krevní agar, ze kterého byla inokulační kličkou naočkována jedna kolonie do kónické zkumavky obsahující 10 ml čerstvého vysterilizovaného LB média. Následně byla kónická zkumavka na noc vložena do termostatu a inkubována při 37 °C a 200 otáčkách za minutu. Do čtyř Erlenmeyerových baněk o objemu 200 ml bylo napipetováno 20 ml sterilního LB média a baňky byly uloženy na noc do termostatu při teplotě 37 °C. Do tří Erlenmeyerových baněk byla naočkována ranní kultura na optickou denzitu OD<sub>600</sub> v rozmezí 0,05–0,09. Následně byly tři baňky obsahující bakteriální kulturu a jedna baňka sloužící jako negativní kontrola vloženy do inkubační komory s třepačkou. Celkem bylo



odebráno devět vzorků, z toho osm v intervalu jedné hodiny, poslední vzorek byl odebrán po 24 hodinách od začátku kultivace. U všech vzorků byla změřena optická densita na jednopaprskovém spektrofotometru při vlnové délce 600 nm ( $OD_{600}$ ).

Stejný postup byl aplikován také pro stanovení růstové rychlosti za přítomnosti subinhibičních dávek kolistin sulfátu. Bylo připraveno LB médium s přidavkem kolistin sulfátu o koncentraci 0,01 mg/l, což představuje jednu setinu MIC citlivého kmene, a LB médium s přidavkem kolistin sulfátu o koncentraci 0,1 mg/l představující jednu desetinu MIC citlivého kmene. Dále byla provedena kultivace a měření optické denzity mechanizmem popsaným výše.

Průměrné doby zdvojení byly poté vypočteny dle následujícího vzorce:

$$GT = \frac{t}{3,3 \log \left( \frac{b}{B} \right)}$$

kde:

$GT$  je doba zdvojení

$t$  je interval mezi měřeními  $b$  a  $B$

$b$  je hodnota  $OD_{600}$  bakteriální populace po čase  $t$

$B$  je počáteční hodnota  $OD_{600}$  bakteriální populace

#### 4.2.11.1 Statistické metody

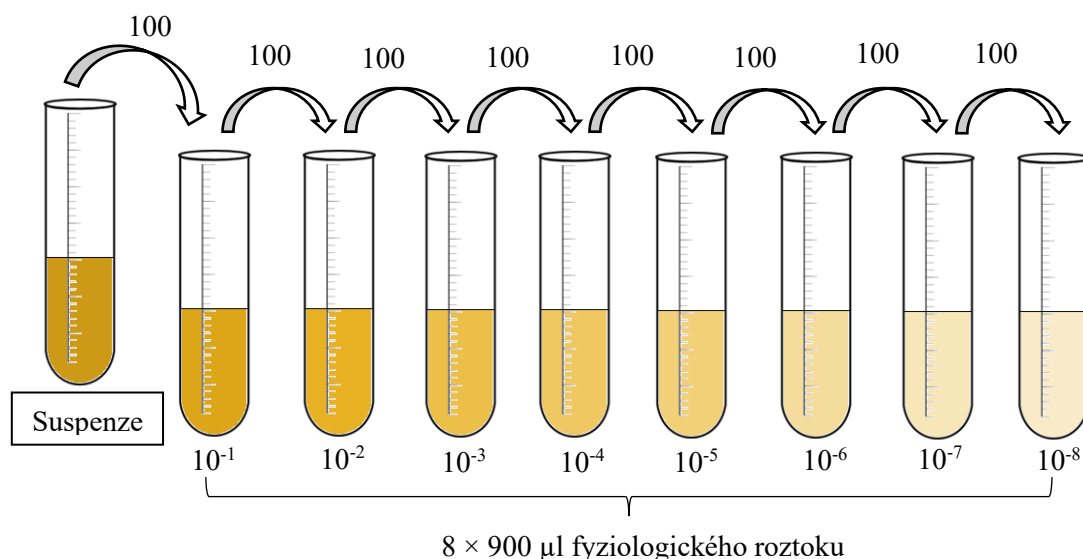
Pro zjištění, zda byly rozdíly mezi dobami zdvojení statisticky významné, byla použita analýza rozptylu (ANOVA) v softwaru RStudio v1.2.5033. Vzhledem k nerovnoměrnému rozdělení dat byla použita neparametrická varianta ANOVA, a to Kruskal-Wallisův test. Hladina významnosti byla stanovena na standardní hodnotu 0,05. Výsledky, které byly v rámci Kruskal-Wallisova testu vyhodnoceny jako signifikantní, byly dále podrobeny post hoc Tukeyho testu pro zjištění rozdílů mezi jednotlivými skupinami. Hladina významnosti byla i zde stanovena na hodnotu 0,05.

#### 4.2.12 Stanovení schopnosti kompetice

Vybrané testované kmeny byly vyočkovány na Brilliance UTI Clarity agar a po confirmaci druhu pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF byla jedna kolonie kultury rozmíchána v 5 ml LB média, dána do termostatu a inkubována přes noc při 37 °C a aeraci 200 otáček za minutu. Ranní kultury byly zředěny v 10 ml LB média na  $OD_{600} = 0,1$  a ve druhém kroku ještě desetkrát naředěny na  $OD_{600} = 0,01$  a 3 ml takto zředěné kultury byly smíchány se 3 ml stejným způsobem připravené kultury druhého testovaného kmene. Jedna zkumavka směsné kultury byla bez přidavku kolistin sulfátu, ve druhém případě byl do zkumavky navíc přidán kolistin sulfát o koncentraci 0,1 mg/l, tedy přibližně jedna desetina MIC citlivého kmene. Takto připravené smíšené kultury byly v triplicátech dány do termostatu a kultivovány při 37 °C a 200 otáčkách za minutu.

Každý den bylo přeneseno 50 µl kultury bez přídavku antibiotika do čerstvého LB média, stejně tak bylo přeneseno 50 µl kultury obsahující subletální dávky kolistin sulfátu do čerstvého LB média obohaceného o kolistin sulfát v koncentraci jedné desetiny MIC citlivého kmene. Takto bylo postupováno až do chvíle, kdy jeden kmen zcela převážil nad druhým kmenem.

V den 0, 2, 6, 12 a 13 byl stanoven počet bakterií na ml (CFU/ml) v médiu pomocí ředící řady s následným výsevem na plotny. Nejdříve byla dle schématu zobrazeném na obrázku 9 připravena ředící řada.



Obrázek 9: Schéma ředící řady, dle které byl připraven požadovaný zákal. První zkumavka značí koncentrovanou suspenzi, která byla postupně ředěna vždy v poměru 1:10 do fyziologického roztoku.

Poté bylo z ředění  $10^{-7}$ , které bylo empiricky stanoveno jako nejvhodnější pro výsev, v triplikátu odebráno 100 µl a hokejkou rozetřeno na plotny bez přídavku kolistin sulfátu (růst citlivého i rezistentního kmene) a na plotny obsahující 3,5 mg/l kolistin sulfátu (růst pouze kmene rezistentního ke kolistinu, což bylo ověřeno negativním výsevem citlivého kmene na plotnu obsahující kolistin sulfát). Takto bylo postupováno v případě směsí kultivovaných za přídavku antibiotika i bez něj. V den 0 bylo zvoleno nižší ředění  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$ . Z vyrostlých kolonií bylo následně spočítáno množství bakterií na 1 ml, tedy colony forming unit (CFU).

Pro ověření, zda po vystavení subletálními dávkami kolistin sulfátu nedošlo ke vzniku rezistence u citlivého kmene, byly na závěr experimentu kolonie vyrostlé na kolistinových plotnách vysety také na plotny obohacené o ampicilin, ke kterému byl rezistentní pouze jeden testovaný kmen (rezistentní ke kolistinu). Nejdříve byl připraven zásobní roztok ampicilinu rozpuštěného v destilované vodě o koncentraci 50 mg/ml, a poté byl zásobní roztok přidán do chromogenního Brilliance UTI Clarity agaru na finální koncentraci 50 mg/l média.

## 5 Výsledky

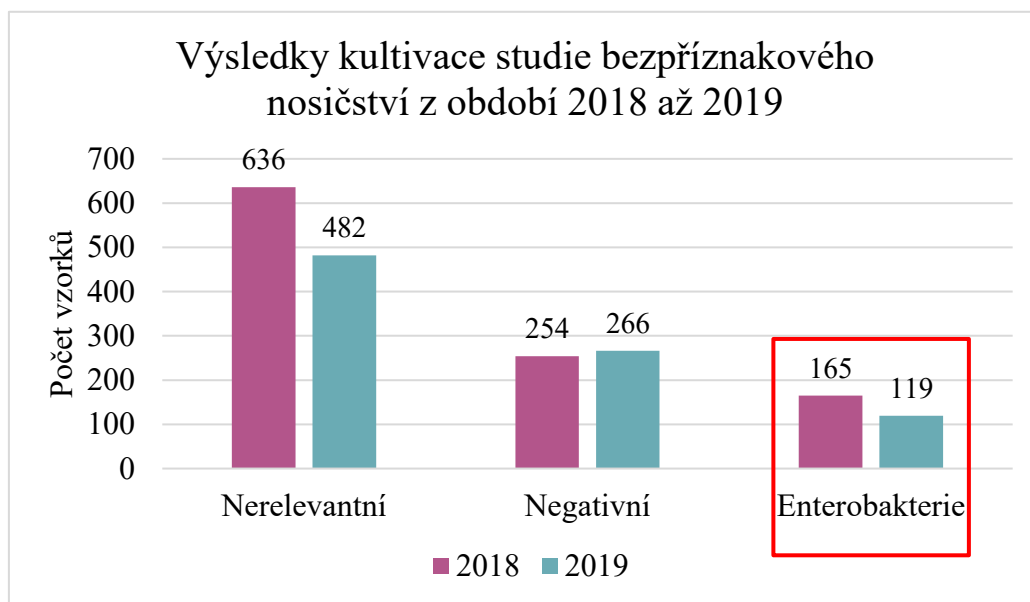
### 5.1 Studie výskytu genů *mcr*

#### 5.1.1 Bezpříznakové nosičství u hospitalizovaných pacientů

##### 5.1.1.1 Výsledky kultivace a druhové identifikace

V rámci projektu bylo vyšetřeno 1922 rektálních výtěrů a vzorků stolice od pacientů Fakultní nemocnice v Motole různých klinik ve dvou obdobích, a to od června do prosince roku 2018 (790 rektálních výtěrů a 265 vzorků stolice) a od ledna do prosince roku 2019 (867 rektálních výtěrů).

V 520 případech byla kultivace negativní, tedy agar obsahující kolistinu zůstal bez nárůstu (254 vzorků za rok 2018 a 266 vzorků za rok 2019). 1118 vzorků obsahovalo pouze izoláty nerelevantní pro tuto studii (636 vzorků za rok 2018 a 482 vzorků za rok 2019, jednalo se o bakterie přirozeně rezistentní ke kolistinu – *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Hafnia* a *Serratia*, kvasinky jako *Candida* nebo bakterie spadající mimo čeleď *Enterobacteriaceae* jako rody *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Staphylococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Sporosarcina*, *Aeromonas*). Zbylých 284 vzorků (165 vzorků z roku 2018 a 119 vzorků z roku 2019) obsahovalo potenciálně rezistentní izoláty enterobakterií. Vzorky obsahující izoláty enterobakterií vyrostlé na selektivním agaru s přidavkem kolistinu tedy činily 14,8 % (n = 284). Přehled výsledků kultivace shrnuje graf 1.



Graf 1: Přehled výsledků kultivace. Z 1922 vzorků stolice a rektálních výtěrů bylo dále pracováno s 284 vzorky obsahujícími izoláty enterobakterií (červeně zvýrazněno). Zbylé vzorky buď byly negativní (na chromogenní půdě nenarostla žádná kolonie rezistentní ke kolistinu) nebo nerelevantní pro studii (izoláty nebyly z čeledi *Enterobacteriaceae*, nebo obsahovaly druhy přirozeně rezistentní ke kolistinu).

Z 284 vzorků bylo získáno 294 izolátů enterobakterií rostoucích na chromogenním agaru s přidavkem kolistinu. Jednalo se o *Klebsiella* spp. (n = 130), *Escherichia coli*

(n = 84), *Enterobacter* spp. (n = 49), *Citrobacter* spp. (n = 22) a *Salmonella* spp. (n = 9). Podrobnější výsledky shrnuje tabulka 8.

Tabulka 8: Přehled získaných izolátů rostoucích na chromogenním agar s přidavkem kolistinu. Celkem bylo získáno 294 izolátů z 284 vzorků rektálních výtěrů a stolic. \*Jeden izolát byl diagnostikován jako *Escherichia hermannii*. \*\*Zahrnuje 25 izolátů *E. coli* rostoucích po okrajích nebo ojedinelé (včetně izolátu pozitivního na přítomnost genu *mcr-1*).

Rod *Klebsiella* zahrnuje druhy *K. pneumoniae* (n = 112), *K. variicola* (n = 15), *K. oxytoca* (n = 3), *K. aerogenes* (dříve nazývaný *Enterobacter aerogenes*, n = 2). Rod *Enterobacter* zahrnuje druhy *E. cloacae* (n = 26), *E. kobei* (n = 16), *E. asburiae* (n = 4), *E. ludwigii* (n = 1). Rod *Citrobacter* zahrnuje rody *C. freundii* (n = 13), *E. braakii* (n = 4), *C. koseri* (n = 2), a jeden izolát pro druhy *C. amalonaticus*, *C. farmeri*, *C. murlinae*. U *Salmonella* spp. nebylo možné rozlišit druh kvůli podobným hodnotám skóre při určování identity pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

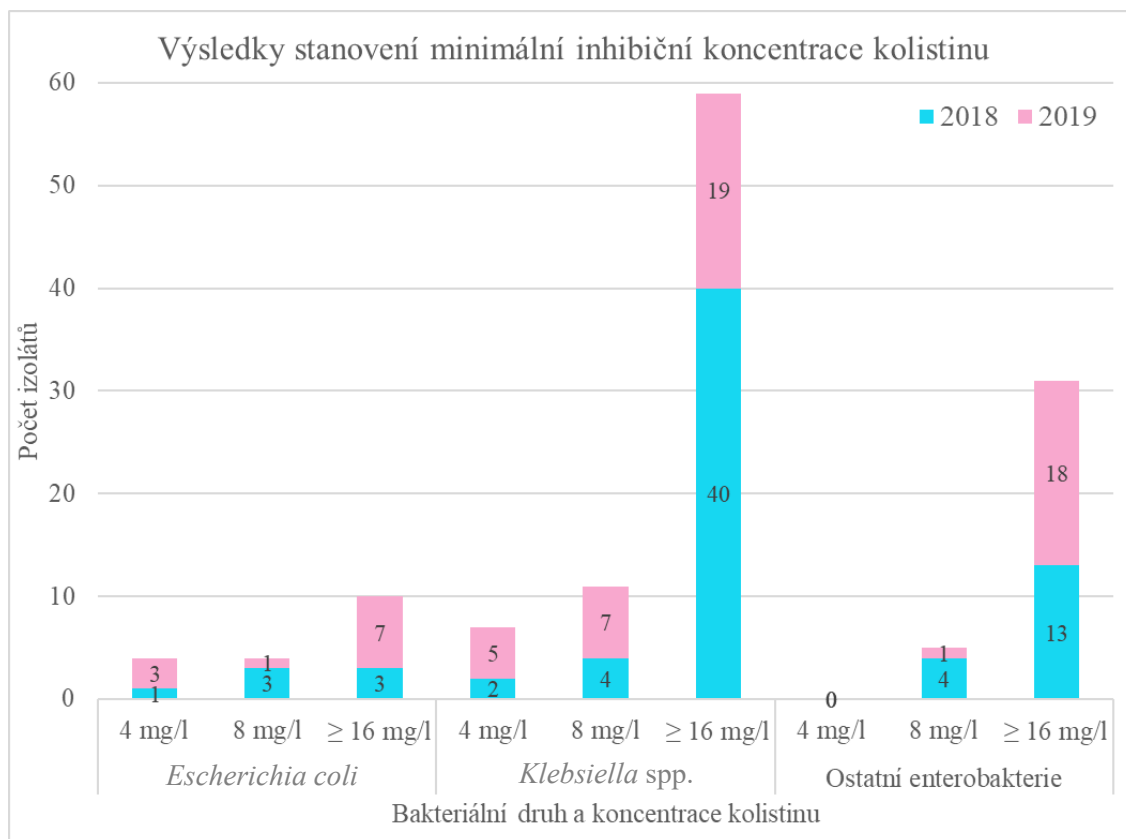
	2018	2019	Celkem
<i>Escherichia coli</i>	37*	47**	84
<i>Klebsiella</i> spp.	78	52	130
<i>Enterobacter</i> spp.	29	20	49
<i>Citrobacter</i> spp.	21	1	22
<i>Salmonella</i> spp.	8	1	9

#### 5.1.1.2 Výsledky testování citlivosti ke kolistinu

U všech 294 izolátů získaných kultivací na selektivních plotnách byla provedena mikrodiluční metoda pro potvrzení rezistence ke kolistinu a kvantitativní stanovení hodnoty MIC. Tato metoda je považována za nejspolehlivější standard pro stanovení citlivosti ke kolistinu. Výsledky byly interpretovány dle hodnot stanovených EUCAST, která označuje za rezistentní ke kolistinu takové izoláty, které jsou schopné růstu při koncentracích vyšších než 2 mg/l kolistinu (EUCAST 2019). Dle výsledků mikrodiluční metody bylo stanoveno 131 izolátů ze 128 vzorků jako rezistentních ke kolistinu, jedná se tak o 6,7 % z celkového počtu 1922 vzorků. Z celkového počtu 131 rezistentních izolátů šlo v 58,78 % případů o rod *Klebsiella* spp., v 13,74 % případů se jednalo o *E. coli*, ve 24,43 % o rod *Enterobacter* spp., 1,53 % zahrnovalo rod *Citrobacter* spp. a 1,53 % rod *Salmonella* spp. Výsledky mikrodiluční metody pro stanovení citlivosti shrnuje tabulka 9 a graf 2.

Tabulka 9: Výsledky stanovení citlivosti pomocí mikrodiluční metody u izolátů narostlých na plotnách obsahujících kolistin o koncentraci 3,5 mg/l. Z celkového počtu 294 izolátů bylo stanoveno 131 jako rezistentních ke kolistinu, z toho 58,78 % zahrnovalo rod *Klebsiella* spp., 13,74 % druh *E. coli*, 24,43 % rod *Enterobacter* spp., 1,53 % rod *Citrobacter* spp. a 1,53 % rod *Salmonella* spp.

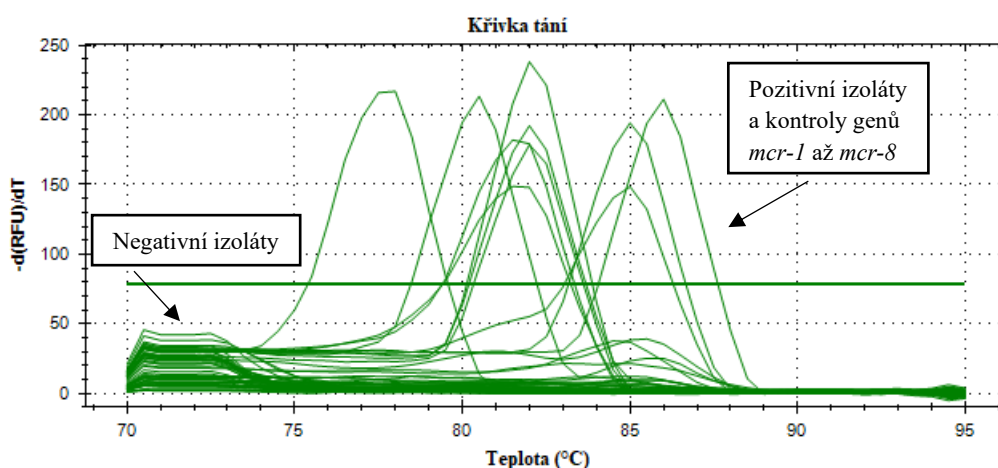
	2018				2019				Celkem
	Citlivé	4 mg/l	8 mg/l	≥16 mg/l	Citlivé	4 mg/l	8 mg/l	≥16 mg/l	
<i>Escherichia coli</i>	30	1	3	3	36	3	1	7	<b>84</b>
<i>Klebsiella</i> spp.	32	2	4	40	21	5	7	19	<b>130</b>
<i>Enterobacter</i> spp.	15	0	1	13	2	0	0	18	<b>49</b>
<i>Citrobacter</i> spp.	19	0	2	0	1	0	0	0	<b>22</b>
<i>Salmonella</i> spp.	7	0	1	0	0	0	1	0	<b>9</b>



Graf 2: Výsledky stanovení minimální inhibiční koncentrace pomocí mikrodiluční metody. Ostatní enterobakterie zahrnují rody *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp. a *Enterobacter* spp.

#### 5.1.1.3 Detekce genů *mcr* metodou PCR a confirmace Sangerovým sekvenováním

U všech vzorků pomnožení i izolátů získaných kultivací na selektivních plotnách obohacených o kolistin byla provedena PCR v reálném čase s následnou analýzou křivky tání amplifikovaného produktu. Výsledek křivky tání je vidět na obrázku 10.

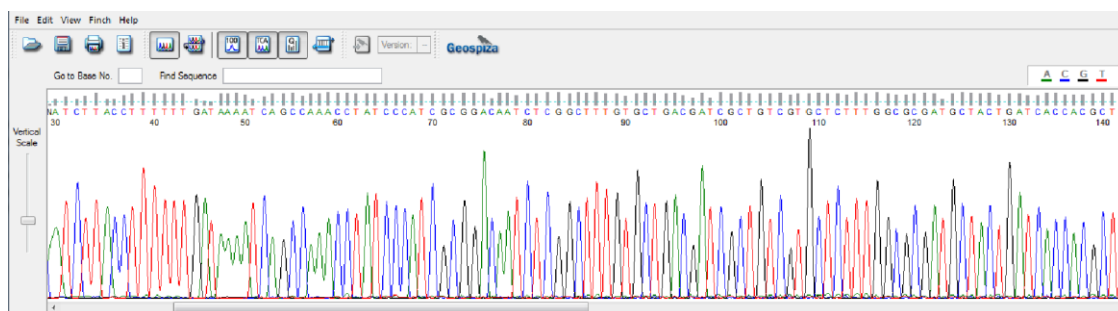


Obrázek 10: Detekce genů *mcr* na základě PCR. Dle porovnání křivky tání pozitivní kontroly a izolátů testovaných na přítomnost tohoto genu lze zjistit, jestli je daný gen v genomu bakterie přítomen.

Křivka tání byla následně porovnána s pozitivními kontrolami pro jednotlivé geny *mcr*. V začátku byly detekovány geny *mcr-1* až *mcr-5*, nicméně po popsání genů *mcr-6*

až *mcr-8* bylo spektrum rozšířeno i o tyto geny a v závěru studie také o gen *mcr-9*. Vzhledem k tomu, že bakterie nesoucí gen *mcr-9* jsou převážně ke kolistinu citlivé (Kieffer et al. 2019), nebyla přítomnost tohoto genu v izolátech izolovaných ze selektivních půd testována, a byla testována pouze v retrospektivní sbírce klinických izolátů enterobakterií (viz dále kapitola 5.1.4.2).

Metodou multiplexové PCR v reálném čase bylo získáno 249 vzorků pomnožení a 58 izolátů enterobakterií získaných kultivací na selektivních plotnách obohacených o kolistin s pozitivním výsledkem amplifikace genů *mcr-1* až *mcr-8* za rok 2018 i 2019. Pro konfirmaci přítomnosti genů *mcr* byly suspektní vzorky amplifikovány pomocí PCR pro jednotlivé geny (singleplex) a v případě positivity bylo pro identifikaci amplifikovaného produktu použito Sangerovo sekvenování. Příklad výsledku Sangerova sekvenování ukazuje obrázek 11, na němž každý vrchol znázorňuje jeden zainkorporovaný dideoxyribonukleotid. Získané sekvence byly porovnány s referenčními sekvencemi genů *mcr* (staženy z databáze GenBank dle publikací popisujících dané geny, viz tabulka 2) pomocí softwaru Geneious verze 10 (Biomatters).



Obrázek 11: Verifikace specifity amplikonu *mcr-1* pomocí Sangerova sekvenování. Každá amplituda znázorňuje jeden zainkorporovaný dideoxyribonukleotid, jednotlivé báze jsou rozlišeny barevně.

U většiny vzorků byla pozitivita multiplexní PCR způsobena nespecifickou amplifikací, neboť cílenou amplifikací jednotlivých genů a Sangerovým sekvenováním byla potvrzena přítomnost genu *mcr* pouze u pěti izolátů. Ve všech případech se jednalo o gen *mcr-1* u izolátu *E. coli*. Dva izoláty pocházely z roku 2018, tři izoláty z roku 2019, všechny byly izolovány ze vzorku výtěru z rektu. Pozitivní vzorky pocházely z různých oddělení nemocnice: ambulance pneumologické kliniky, jednotky intenzivní péče pro dospělé na klinice anesteziologie a resuscitace, dětského kardiocentra a kliniky dětské chirurgie (JIP a standard). Překvapivě byl v jednom případě izolát citlivý ke kolistinu (P1301A, MIC 0,25 mg/l), ve dvou případech dosahovala MIC hodnoty 4 mg/l a ve dvou případech 8 mg/l. Citlivý izolát byl detekován pomocí analýzy PCR DNA z pomnožení, jelikož selektivní kultivace byla negativní. Po vyočkování vzorku pomnožení na neselektivní půdu bez přídavku kolistinu bylo možno detekovat citlivý kmen nesoucí gen *mcr-1*.

#### 5.1.1.4 Výsledky stanovení citlivosti k dalším typům antibiotik

Testování citlivosti izolátů pozitivních na přítomnost genu *mcr-1* ukázalo, že izoláty jsou často rezistentní k betalaktamovým antibiotikům (ampicilin, ampicilin/sulbaktam, cefazolin, piperacilin). Výjimku tvořil pouze k betalaktamům citlivý izolát P1301A, který byl i přes nosičství genu *mcr-1* citlivý ke kolistinu. Ve všech případech byla pozorovaná rezistence k tetracyklinu a v 80 % také ke kotrimoxazolu a ciprofloxacinu. V jednom případě byla pozorovaná rezistence k tigecyklinu, který se jako rezervní širokospektré antibiotikum používá právě na léčbu infekcí způsobených enterobakteriemi. Přehled výsledků testování citlivosti shrnují tabulky 10 a 11.

Tabulka 10: Výsledky testování citlivosti pomocí mikrodiluční metody u izolátů s *mcr-1* (sada G-I). Hodnoty jsou uvedené v jednotkách mg/l. Červeně zvýrazněné hodnoty značí rezistenci.

AMP – ampicilin, AMS – ampicilin/sulbaktam, CFZ – cefazolin, CXM – cefuroxim, AZT – aztreonam, GEN – gentamicin, AMK – amikacin, COL – kolistin, T/S – kotrimoxazol/, CIP – ciprofloxacín, CMP – chloramfenikol, TET – tetracyklin.

	AMP	AMS	CFZ	CXM	AZT	GEN	AMK	COL	T/S	CIP	CMP	TET
P642A	>128	16/8	16	16	<0,12	0,5	2	4	>4/76	0,5	8	>32
P732A	>128	128/64	16	8	<0,12	1	4	8	>4/76	>8	4	>32
P1301A	2	2/1	2	4	0,25	1	2	0,25	0,25/4,75	8	>32	>32
P1519A	>128	32/16	8	8	0,5	2	2	4	>4/76	>8	4	>32
P1622A	>128	128/64	>16	8	0,25	0,5	1	4	>4/76	>8	8	>32

Tabulka 11: Výsledky testování citlivosti pomocí mikrodiluční metody u izolátů s *mcr-1* (sada G-II). Hodnoty jsou uvedené v jednotkách mg/l. Červeně zvýrazněné hodnoty značí rezistenci.

PIP – piperacilin, PIT – piperacilin/tazobaktam, CTX – cefotaxim, CAZ – ceftazidim, CPZ – cefoperazon, CPS – cefoperazon/sulbaktam, CEP – cefepim, MER – meropenem, ERT – ertapenem, TGC – tigecyklin, NET – netilmicin, TOB – tobramycin.

	PIP	PIT	CTX	CAZ	CPZ	CPS	CEP	MER	ERT	TGC	NET	TOB
P642A	>128	2/4	0,25	1	8	4/2	0,25	<0,12	0,03	1	1	1
P732A	>128	<1/4	<0,06	0,25	>64	8/4	0,25	<0,12	<0,015	0,25	0,5	4
P1301A	<1	<1/4	<0,06	0,5	<0,5	<0,5/0,25	<0,12	<0,12	<0,015	0,25	1	1
P1519A	64	<1/4	0,12	0,25	8	2/1	<0,12	<0,12	<0,015	0,25	0,5	1
P1622A	>128	<1/4	0,12	1	>64	16/8	0,25	<0,12	0,03	0,25	0,5	0,5

#### 5.1.2 Pacienti s cestovatelskou anamnézou

##### 5.1.2.1 Výsledky kultivace a druhové identifikace

V rámci projektu bylo vyšetřeno 177 vzorků stolic od českých cestovatelů (n = 131, 74 %) nebo osob žijících přechodně v České republice (n = 46, 26 %), kteří byli podrobeni parazitologickému vyšetření mezi srpnem roku 2018 a zářím roku 2019. Průměrný věk pacientů byl 28,7 let (medián 30 let) a 98 vzorků pocházelo od mužů (55,4 %). Cíl cesty / země původu byly následující: Afrika (30/1), jihovýchodní Asie (26/6), Evropská unie



(19/14), Střední východ (14/6), indický subkontinent (10/1), Evropa (8/4), Jižní Amerika (7/4), Rusko (7/7), Severní Amerika (4/2), Austrálie a Nový Zéland (4/1) a Kuba (2/0). Postupováno bylo podobně jako u studie bezpříznakového nosičství u hospitalizovaných pacientů. Celkem bylo získáno 15 izolátů (pocházejících od 14 jedinců) z čeledi *Enterobacteriaceae* rezistentních ke kolistinu (znázorněno v tabulce 12), což představuje prevalenci 7,9 %.

Tabulka 12: Počet enterobakterií rezistentních ke kolistinu kultivovaných ze vzorků stolic (n = 177) a jejich hodnoty MIC.

	≥4	≥8	≥16	Celkově (n = 15)	Cestovatelé	Osoby trvale žijící v zahraničí
<i>Escherichia coli</i>	3	1	3	7	3	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	1	6	7	5	2
<i>Enterobacter kobei</i>	0	0	1	1	1	0

#### 5.1.2.2 Detekce genů *mcr* metodou PCR a confirmace Sangerovým sekvenováním

V rámci PCR analýzy byly zaznamenány dva pozitivní vzorky *E. coli* (S340A a S377A), u nichž byla následně přítomnost genu *mcr* potvrzena Sangerovým sekvenováním. U obou izolátů byl prokázán gen *mcr-1*, což představuje prevalenci 1,1 %, a MIC ke kolistinu 4 mg/l. Izolát S340A byl kultivován ze stolice 38leté ženy původem z Nového Zélandu, druhý izolát S377A byl izolován ze stolice 32leté ženy s trvalým bydlištěm v Itálii. V době sběru vzorků obě ženy dočasně žily v České republice.

#### 5.1.2.3 Výsledky stanovení citlivosti k dalším typům antibiotik

Testování citlivosti ukázalo, že oba izoláty *E. coli* S340A i S377A jsou rezistentní k ampicilinu, ampicilinu v kombinaci s inhibitorem betalaktamázy sulbaktamem, cefazolinu, kolistinu, kotrimoxazolu, ciprofloxacinu, tetracyklinu a piperacilinu. Izolát S340A byl navíc rezistentní ke gentamicinu, chloramfenikolu, netilmicinu a tobramycinu. Izolát S377A pak byl oproti izolátu S340 rezistentní k cefuroximu, cefotaximu, ceftazidimu a cefoperazonu. MIC antibiotik obou kmenů jsou uvedeny v tabulce 13 a 14.

Tabulka 13: Výsledky testování citlivosti pomocí mikrodiluční metody u izolátů pozitivních na nosičství genu *mcr-1* (sada G-I). Hodnoty jsou uvedené v jednotkách mg/l. Červeně zvýrazněné hodnoty značí rezistenci.

AMP – ampicilin, AMS – ampicilin/sulbaktam, CFZ – cefazolin, CXM – cefuroxim, AZT – aztreonam, GEN – gentamicin, AMK – amikacin, COL – kolistin, T/S – kotrimoxazol, CIP – ciprofloxacín, CMP – chloramfenikol, TET – tetracyklin.

	AMP	AMS	CFZ	CXM	AZT	GEN	AMK	COL	T/S	CIP	CMP	TET
S340A	>128	32/16	>16	8	<0,12	>32	1	4	>4/76	>8	>32	>32
S377A	>128	16/8	>16	>64	2	0,5	≤0,12	4	>4/76	>1	4	>32



Tabulka 14: Výsledky testování citlivosti pomocí mikrodiluční metody u izolátů pozitivních na nosičství genu *mcr-1* (sada G-II). Hodnoty jsou uvedené v jednotkách mg/l. Červeně zvýrazněné hodnoty značí rezistenci.

PIP – piperacilin, PIT – piperacilin/tazobaktam, CTX – cefotaxim, CAZ – ceftazidim, CPZ – cefoperazon, CPS – cefoperazon/sulbaktam, CEP – cefepim, MER – meropenem, ERT – ertapenem, TGC – tigecyklin, NET – netilmicin, TOB – tobramycin.

	PIP	PIT	CTX	CAZ	CPZ	CPS	CEP	MER	ERT	TGC	NET	TOB
S340A	>128	<1/4	0,25	1	8	4/2	0,25	<0,12	<0,015	0,5	16	>8
S377A	>128	<1/4	8	>4	>64	8/4	>4	<0,12	<0,015	0,5	0,5	0,5

### 5.1.3 Klinické izoláty vykazující rezistenci ke kolistinu

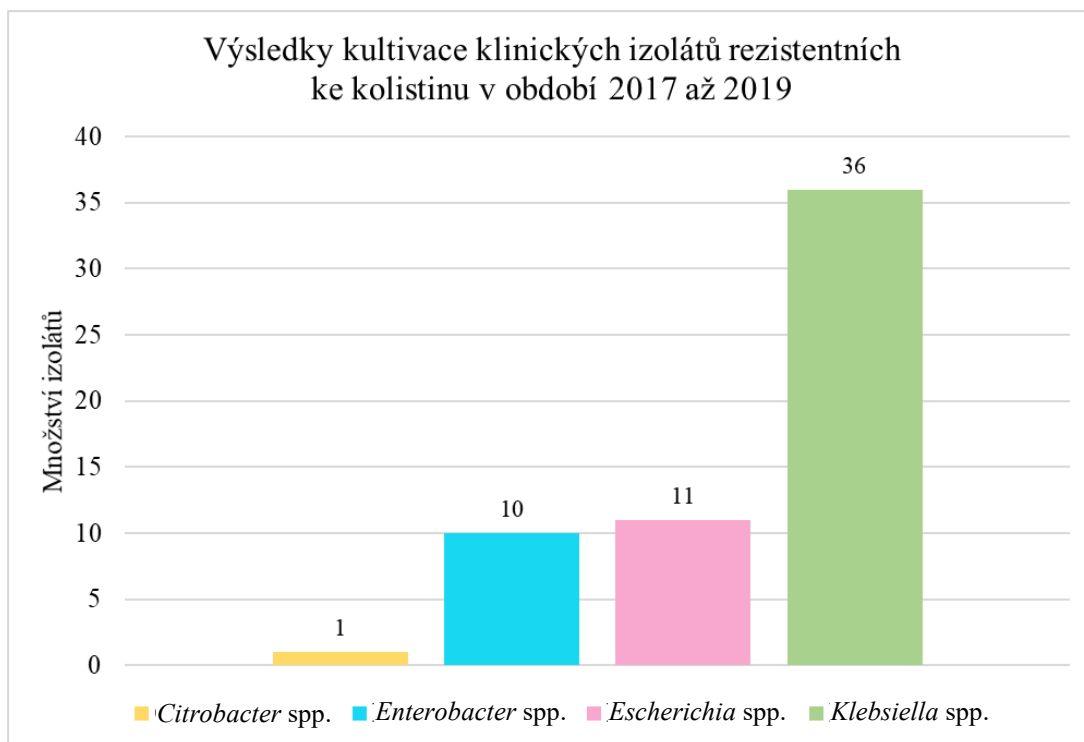
#### 5.1.3.1 Výsledky kultivace a druhové identifikace

Při analýze izolátů enterobakterií rezistentních ke kolistinu od pacientů s klinickými symptomy infekce bylo zkoumáno 58 izolátů získaných mezi lety 2017 a 2019 z různých klinických materiálů uvedených v tabulce 15.

Na základě druhové identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF byly získány izoláty následujících bakteriálních rodů: *Enterobacter* spp. (n = 10, *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. kobei*), *Escherichia* spp. (n = 11, *E. coli*), *Citrobacter* spp. (n = 1, *C. amalonaticus*) a *Klebsiella* spp. (n = 36, *K. pneumoniae*, *K. variicola*). Přehled izolátů rezistentních ke kolistinu získaných od pacientů s klinickými symptomy shrnuje graf 3.

Tabulka 15. Přehled klinických materiálů, ze kterých pocházely získané rezistentní izoláty seřazené dle četnosti. BAL – bronchoalveolární laváž, ETR – endotracheální aspirát

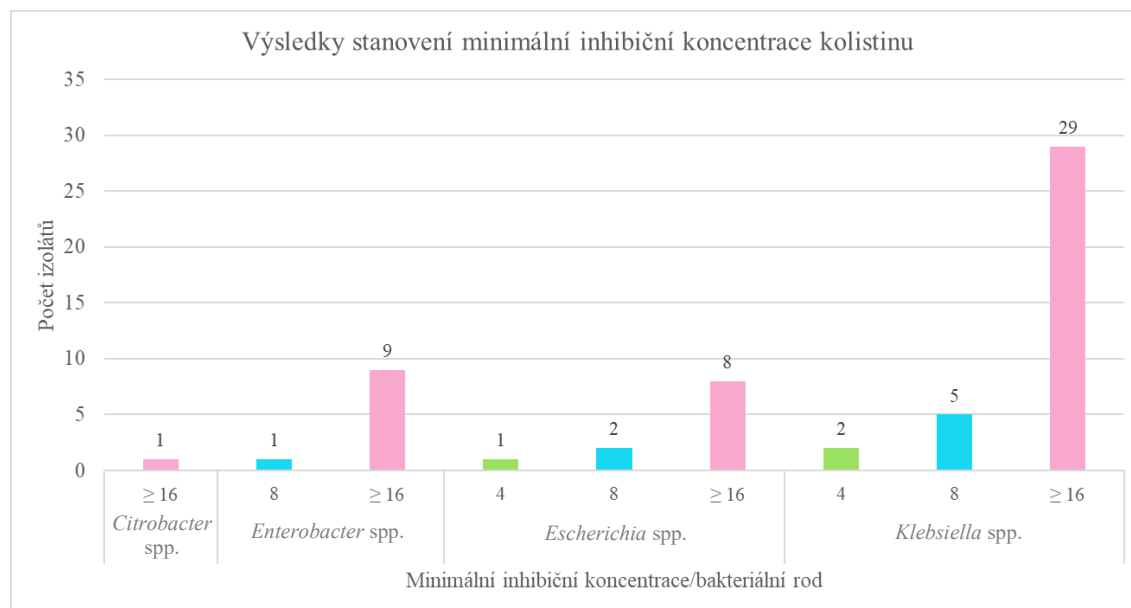
Rod	Původ vzorku	Množství rezistentních izolátů	Celkem
<i>Citrobacter</i> spp.	výtěr z rektu	1	1
<i>Enterobacter</i> spp.	stěr z rány	3	10
	hemokultura	2	
	sputum	2	
	katetr	1	
	moč	1	
	stěr z nosu	1	
<i>Escherichia</i> spp.	moč	4	11
	stěr z rány	2	
	aspirát	1	
	BAL	1	
	hemokultura	1	
	hnis	1	
	výtěr z rektu	1	
<i>Klebsiella</i> spp.	moč	11	36
	sputum	11	
	aspirát	5	
	výtěr z rektu	4	
	hemokultura	2	
	ETR	1	
	obsah z drénu	1	
	stěr z bronchu	1	



Graf 3: Výsledky kultivace klinických izolátů rezistentních ke kolistinu v období 2017 až 2019 získaných od pacientů s klinickými symptomy infekce. Nejzastoupenější je rod *Klebsiella* spp. (n = 36), *Escherichia* spp. (n = 11), *Enterobacter* spp. (n = 10), nejméně pak rod *Citrobacter* spp. (n = 1).

#### 5.1.3.2 Výsledky testování citlivosti ke kolistinu

U získaných 58 izolátů byla provedena mikrodiluční metoda pro kvantitativní stanovení hodnoty MIC kolistinu. Celkem tři izoláty dosahovaly hodnoty MIC 4 mg/l, osm izolátů 8 mg/l a 47 izolátů vykazovalo vysoce rezistentní fenotyp s MIC  $\geq 16$ . Výsledky stanovení MIC u klinických rezistentních izolátů shrnuje graf 4 a tabulka 16.



Graf 4: Přehled výsledků minimální inhibiční koncentrace kolistinu u 58 klinických izolátů rezistentních ke kolistinu.

Tabulka 16: Přehled výsledků minimální inhibiční koncentrace u 58 klinických izolátů rezistentních ke kolistinu.

	MIC (mg/l)			Celkem
	4	8	≥16	
<i>Citrobacter</i> spp.	0	0	1	1
<i>Enterobacter</i> spp.	0	1	9	10
<i>Escherichia</i> spp.	1	2	8	11
<i>Klebsiella</i> spp.	2	5	29	36

#### 5.1.3.3 Detekce genů *mcr* metodou PCR a confirmace Sangerovým sekvenováním

Vzhledem k tomu, že izoláty nesoucí gen *mcr-9* bývají převážně ke kolistinu citlivé (Kieffer et al. 2019), byla sledována přítomnost pouze genů *mcr-1* až *mcr-8*. Metodou kvantitativní PCR bylo testováno všech 58 izolátů s následnou confirmací pomocí Sangerova sekvenování. Po provedení Sangerova sekvenování byl gen *mcr* potvrzen u třech izolátů (KOL63 původem z moči, KOL82 původem ze stěru z operační rány a KOL96 původem z bronchoalveolární laváže). Ve všech případech se jednalo o izolát *E. coli* s hodnotami MIC 8 (KOL63, KOL82) a 4 (KOL96) mg/l. U dvou pacientů byl izolát rezistentní ke kolistinu nesoucí gen *mcr-1* (KOL63 a KOL96) získán také paralelně ze vzorku výtěru z rektu v rámci části projektu zaměřené na bezpříznakové nosičství kolistinové rezistence. Prevalence plazmidově vázané rezistence ke kolistinu u enterobakterií izolovaných z klinických materiálů činila 5,2 % (3/58) vzorků.

#### 5.1.3.4 Výsledky testování citlivosti k dalším typům antibiotik

U izolátů rezistentních ke kolistinu nesoucích gen *mcr-1* byla provedena mikrodiluční metoda pro stanovení citlivosti k dalším typům antibiotik. Všechny izoláty byly kromě kolistinu rezistentní také k některým betalaktamovým antibiotikům (k ampicilinu, ampicilinu v kombinaci se sulbaktamem, cefazolinu a piperacilinu), kotrimoxazolu, ciprofloxacinu a tetracyklinu. Izolát KOL63 byl navíc rezistentní k cefoperazonu a cefoperazonu v kombinaci se sulbaktamem a izolát KOL82 byl navíc rezistentní k cefuroximu, chloramfenikolu a tigecyklinu. Všechny izoláty však zůstaly citlivé k aztreonamu, karbapenemům (meropenem, ertapenem), aminoglykosidům (gentamicin, amikacin, netilmicin, tobramycin), k některým cefalosporinům (cefotaxim, ceftazidim, cefepim) a piperacilinu v kombinaci s tazobaktamem. Hodnoty MIC u izolátů nesoucích gen *mcr-1* jsou shrnuté v tabulkách 17 a 18.

Tabulka 17: Výsledky testování citlivosti pomocí mikrodiluční metody u rezistentních klinických kmenů (sada G-I). Hodnoty jsou uvedené v jednotkách mg/l. Červeně jsou zvýrazněny hodnoty spojené s rezistencí.

AMP – ampicilin, AMS – ampicilin/sulbaktam, CFZ – cefazolin, CXM – cefuroxim, AZT – aztreonam, GEN – gentamicin, AMK – amikacin, COL – kolistin, T/S – kotrimoxazol, CIP – ciprofloxacin, CMP – chloramfenikol, TET – tetracyklin.

	AMP	AMS	CFZ	CXM	AZT	GEN	AMK	COL	T/S	CIP	CMP	TET
KOL63	>128	64/32	>16	4	<0,12	1	1	8	>4/76	>8	4	>32
KOL82	>128	64/32	8	32	0,5	1	1	8	>4/76	>8	>32	>32
KOL96	>128	32/16	8	8	<0,12	0,5	1	4	>4/76	>8	4	>32

Tabulka 18: Výsledky testování citlivosti pomocí mikrodiluční metody u rezistentních klinických kmenů (sada G-II). Hodnoty jsou uvedené v jednotkách mg/l. Červeně jsou zvýrazněny hodnoty spojené s rezistencí.

PIP – piperacilin, PIT – piperacilin/tazobaktam, CTX – cefotaxim, CAZ – ceftazidim, CPZ – cefoperazon, CPS – cefoperazon/sulbaktam, CEP – cefepim, MER – meropenem, ERT – ertapenem, TGC – tigecyklin, NET – netilmicin, TOB – tobramycin.

\*Izolát od stejného pacienta původem z výtěru z rekta taktéž nesoucí gen *mcr-1* vykazoval rezistenci k cefoperazonu s hodnotou MIC >64 mg/l.

	PIP	PIT	CTX	CAZ	CPZ	CPS	CEP	MER	ERT	TGC	NET	TOB
KOL63	>128	<1/4	0,12	0,5	32	16/8	0,25	<0,12	<0,015	0,25	0,5	1
KOL82	>128	4/4	0,25	1	16	8/4	<0,12	<0,12	<0,015	1	0,5	0,5
KOL96	>128	<1/4	0,12	1	2*	2/1	<0,12	<0,12	<0,015	0,5	1	1

#### 5.1.4 Retrospektivní analýza sbírkových izolátů

##### 5.1.4.1 Výsledky kultivace a druhové identifikace

V rámci retrospektivní analýzy sbírky izolátů izolovaných v letech 2011–2019 bylo po kultivaci na chromogenním agaru bez přídavku kolistinu a druhové klasifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF analyzováno 500 vzorků dříve testovaných na produkci karbapenemáz a/nebo širokospektrých betalaktamáz. Jednalo se o izoláty izolované z různých klinických materiálů. Ve 150 případech šlo o rod *Enterobacter* spp., dále bylo detekováno 339 izolátů rodu *Klebsiella* spp., deset izolátů *Citrobacter freundii* a jeden izolát *Salmonella senftenberg*.

##### 5.1.4.2 Detekce genů *mcr* metodou PCR a potvrzení Sangerovým sekvenováním

Metodou multiplexní qPCR byly izoláty testovány na přítomnost genů *mcr-1* až *mcr-8* a celkem bylo získáno 124 suspektních izolátů. Po provedení singleplexové PCR pro detekci genů *mcr-1* až *mcr-8* s vyšší specifitou bylo získáno deset vzorků suspektních na přítomnost genu *mcr-5* (*Enterobacter* spp., n = 9; *Escherichia coli*, n = 1). Dále tři vzorky byly suspektní na přítomnost *mcr-7*, ve všech případech šlo o bakterii *Klebsiella pneumoniae*. Pomocí Sangerova sekvenování se ale přítomnost genů *mcr* nepotvrdila ani v jednom případě. Po popsání genu *mcr-9* (Kieffer et al. 2019) byly všechny izoláty otestovány na jeho přítomnost. Ze singleplexové PCR bylo vyhodnoceno 14 izolátů pozitivních na přítomnost genu *mcr-9*. Po provedení potvrzení pomocí Sangerova sekvenování byl gen *mcr-9* potvrzen u všech izolátů. Prevalence nosičství genu *mcr-9* tak činí 2,8 %.

#### 5.1.4.3 Výsledky testování citlivosti

U 17 izolátů suspektních na přítomnost genů *mcr-1* až *mcr-8* (které z celkového počtu 124 suspektních izolátů vykazovaly nejsilnější shodu křivky tání) byla provedena mikrodiluční metoda pro stanovení citlivosti ke kolistinu. Pouze jeden izolát (*Enterobacter asburiae*) vykazoval vyšší než hraniční hodnotu MIC stanovenou organizací EUCAST (za rezistentní ke kolistinu jsou označeny takové izoláty, které jsou schopny růstu při koncentracích vyšších než 2 mg/l kolistinu) (EUCAST 2019). V tomto případě šlo o hodnotu vyšší než 16 mg/l. Vzhledem k tomu, že se u žádného izolátu nepotvrdila přítomnost některého z genů *mcr-1* až *mcr-8*, nebyly další suspektní izoláty testovány na kolistinovou rezistenci.

Pro stanovení citlivosti ke kolistinu byla provedena mikrodiluční metoda také u 14 izolátů s genem *mcr-9*, která ukázala ve 12 případech citlivost ke kolistinu s maximální hodnotou MIC 0,5 mg/l. Ve dvou případech byly kmeny rezistentní s hodnotou MIC 8 a >16 mg/l. Gen *mcr-9* byl detekován u izolátů pocházejících z různých klinických materiálů (sputum, moč, hemokultura atd.) v letech 2011 až 2017, přičemž největší záchyt byl z roku 2013 (28,6 %, 4/14). Většina izolátů patřila k rodu *Enterobacter* spp. (85,7 %, 12/14). Výsledky shrnuje tabulka 19.

Tabulka 19: Přehled kmenů pozitivních na nosičství genu *mcr-9*. Převážně se jednalo o rod *Enterobacter* spp. a kromě dvou izolátů byly všechny kmeny citlivé ke kolistinu. Vzorky pocházely z různých klinických materiálů a byly izolované v období let 2011 až 2017.

\*Původní název *Enterobacter aerogenes*

\*\*Při opakovaném testování pozorován také paradoxní růst v jamce s 1 mg/l kolistinu, z níž byl potvrzen růst odpovídajícího izolátu.

ETR – endotracheální aspirát

Číslo izolátu	Odebraný materiál	Datum odběru	Bakteriální druh	MIC kolistinu (mg/l)
46	sputum	2011	<i>Enterobacter cloacae</i>	≤0,25
117	moč	2013	<i>Citrobacter freundii</i>	≤0,25
142	ETR	2013	<i>Klebsiella aerogenes</i> *	≤0,25
235	výtěr z rektu	2013	<i>Enterobacter cloacae</i>	≤0,25
258	moč	2013	<i>Enterobacter cloacae</i>	≤0,25**
309	ETR	2014	<i>Enterobacter cloacae</i>	>16
316	stěr z rány	2014	<i>Enterobacter aerogenes</i>	8
322	stěr z rány	2014	<i>Enterobacter cloacae</i>	≤0,25
356	moč	2015	<i>Enterobacter cloacae</i>	≤0,25
372	stolice	2015	<i>Enterobacter cloacae</i>	≤0,25
378	hemokultura	2016	<i>Enterobacter cloacae</i>	≤0,25
384	dutina ústní	2016	<i>Enterobacter cloacae</i>	≤0,25
385	výtěr z rektu	2016	<i>Enterobacter cloacae</i>	≤0,25
468	výtěr z rektu	2017	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,5

Izoláty pozitivní na přítomnost genu *mcr-9* byly testovány také na rezistenci ke karbapenemům. Celkem 35,7 % (5/14) izolátů bylo rezistentních k alespoň jednomu karbapenemu (meropenem, imipenem, ertapenem).

Vzhledem k převážné citlivosti ke kolistinu byl následně proveden test indukce rezistence dle publikace uvedené autory Kieffer et al. (Kieffer et al. 2019) (viz dále kapitola 5.2).

#### 5.1.5 Výsledky celogenomového sekvenování izolátů obsahujících gen *mcr*

Izoláty ze všech souborů, u nichž byla Sangerovým sekvenováním potvrzena přítomnost genu *mcr-1*, byly následně analyzovány celogenomovým sekvenováním. Celkem bylo získáno osm neduplicitních izolátů *E. coli* pozitivních na přítomnost genu *mcr-1* za období let 2018 až 2019. Nejvíce izolátů bylo detekováno v rámci studie bezpříznakového nosičství u hospitalizovaných pacientů (pět izolátů), dva u cestovatelů, tři mezi klinickými rezistentními izoláty (ovšem dva z nich pocházely od pacientů, u nichž se gen *mcr-1* prokázal rovněž ze vzorku rektálního výtěru) a žádný nebyl nalezen v bakteriální sbírce kmenů testovaných na produkci širokospektrých betalaktamáz a/nebo karbapenemáz. *In silico* bioinformatická analýza všech kmenů ukázala geny rezistence a chromozomální mutace korespondující s rezistentním fenotypem uvedeným v tabulce 20, která přehledně shrnuje charakteristiky kmenů nesoucích gen *mcr-1*. Byla zjištěna vysoká genetická variabilita mezi jednotlivými kmeny na základě MLST a cgMLST analýzy, vylučující možnost genetické příbuznosti jednotlivých kmenů. Dále byla detekována široká škála plazmidů nesoucích gen *mcr-1* a/nebo jiné geny rezistence (viz tabulka 20). Gen *mcr-1* (ve všech případech alela *mcr-1.1*) se podařilo lokalizovat u pěti izolátů na plazmidu IncX4 a u dvou izolátů na plazmidu IncHI2. V případě izolátu S340A byla detekována přítomnost plazmidu IncFIB(pLF82), nicméně v rámci analýzy provedené pomocí softwaru PlasmidSPAdes, kdy jsou analyzovány plazmidové sekvence, překvapivě nebyla detekována přítomnost genu *mcr-1.1* na detekovaném plazmidu, což naznačovalo chromozomální inkorporaci genu *mcr-1*. Pro detekci lokalizace genu *mcr-1* u izolátu S340A byla provedena tzv. „long-read“ sekvenace pomocí MinION platformy (provedeno externí laboratoří). Následně byly krátké i dlouhé fragmenty složeny pomocí programu Unicycler v0.4.7 a jeden cirkulární kontig korespondoval s plazmidem IncFIB(pLF82), který však neobsahoval žádné geny rezistence nalezené pomocí databáze ResFinder. Gen *mcr-1* a další geny rezistence uvedené v tabulce 20 byly lokalizovány v rámci chromozomu. Gen *mcr-1* byl nalezen mezi inzerčními sekvencemi v dříve popsané struktuře IS*Apl1*-*mcr-1*-ORF-IS*Apl1* známé jako transpozon Tn6330.

Tabulka 20: Přehled izolátů pozitivních na přítomnost genu *mcr-1*. cgST: sekvenční typ pro metodu core genome MLST. ST: sekvenční typ dle Achtmanova MLST schématu / Pasteurova institutu, MIC: minimální inhibiční koncentrace.

AMP – ampicillin, AMS – ampicillin/sulbaktam, CFZ – cefazolin, GEN – gentamicin, CXM – cefuroxim, TMP-SXT – trimetoprim/sulfametoxazol, CIP – ciprofloxacin, CMP – chloramfenikol, TET – tetracyklin, PIP – piperacillin, CAZ – ceftazidim, CPZ – cefoperazon, TGC – tigecyklin, NET – netilmicin, TOB – tobramycin.

Plazmid, na němž byl přítomen gen *mcr-1.1*, je označen tučně.

\*Od stejného pacienta jako KOL63.

\*\*Od stejného pacienta jako P1622A.

\*\*\*Byly detekované geny rezistence, ale nebyly testovány korespondující antibiotika: *mdf(A)*, *mph(A)* – makrolidy; *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id* – streptomycin; *aph(3')-Ia* – kanamycin; *aadA1*, *aadA5* – streptomycin, spectinomycin.

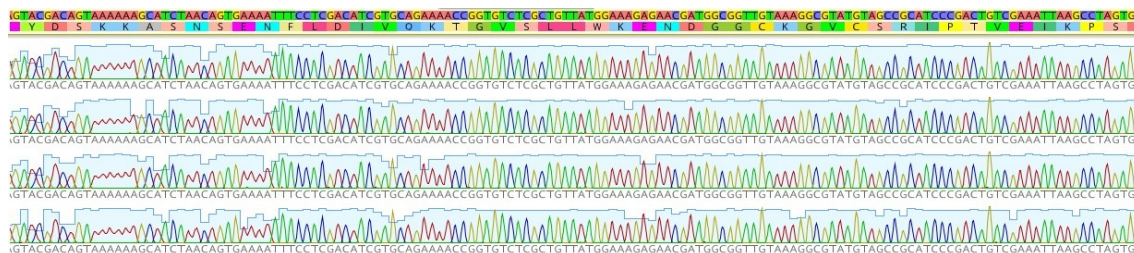
Izolát	P642A	P732A*	P1301A	P1519A	S340A	S377A	KOL82	KOL96**
Druh	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
Rok izolace	2018	2018	2019	2019	2019	2019	2019	2019
cgST	81202	71872	58727	31972	42227	99867	44126	31972
ST	8778/716	69/1	744/2	1193/53	156/19	23/7	4204/2	1193/53
MIC kolistinu (mg/l)	8	8	0,25	4	4	4	8	4
Gen <i>mcr</i>	<i>mcr-1.1</i>	<i>mcr-1.1</i>	<i>mcr-1.1</i>	<i>mcr-1.1</i>	<i>mcr-1.1</i>	<i>mcr-1.1</i>	<i>mcr-1.1</i>	<i>mcr-1.1</i>
Detekované plazmidy	<b>IncX4</b> ; IncFIB(AP001918); IncFII; IncQ1, IncX1	<b>IncX4</b> ; IncFIA; IncFIB(AP001918); IncQ1	<b>IncX4</b> ; IncFIA; IncFIB(AP001918); IncFII(pCoo); IncQ1	<b>IncHI2</b> ; Col(BS512); Col156; IncFIA; IncFIB(AP001918); IncHI2A; IncQ1	IncFIB(pLF82)	<b>IncX4</b> ; Col(BS512), IncFIB(AP001918), IncFIC(FII), IncI1	<b>IncX4</b> ; IncFIB(AP001918), IncFII, IncI1, IncI2, IncI1- I(Gamma), p0111	<b>IncHI2</b> ; Col(BS512), Col156, IncFIA, IncFIB(AP001918), IncHI2A
Další zjištěné rezistence k antimikrobiálním látkám	AMP, AMS, CFZ, CXM, TMP-SXT, TET, PIP, TGC	AMP, AMS, CFZ, TMP-SXT, CIP, TET, PIP, CPZ	CIP, CMP, TET	AMP, AMS, CFZ, TMP-SXT, CIP, TET, PIP	AMP, AMS, CFZ, GEN, TMP-SXT, CIP, CMP, TET, PIP, NET, TOB	AMP, AMS, CFZ, CXM, TMP-SXT, CIP, TET, PIP, CTX, CAZ, CPZ, CEP	AMP, AMS, CFZ, CXM, TMP-SXT, CIP, CMP, TET, PIP, TGC	AMP, AMS, CFZ, TMP-SXT, CIP, TET, PIP
Geny antimikrobiální rezistence***	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> ; <i>aadA1</i> ; <i>aph(6)-Id</i> ; <i>aph(3'')-Ib</i> ; <i>qnrS1</i> ; <i>sul1</i> ; <i>sul2</i> ; <i>dfrA1</i> ; <i>tet(A)</i> ; <i>mdf(A)</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> ; <i>aadA5</i> ; <i>aph(6)-Id</i> ; <i>aph(3'')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i> ; <i>catA1</i> ; <i>sul1</i> ; <i>sul2</i> ; <i>dfrA17</i> ; <i>tet(B)</i> ; <i>mph(A)</i> (mutace v <i>gyrA</i> , <i>parC</i> a <i>parE</i> asociované s CIP rezistencí)	<i>aph(3'')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i> ; <i>aph(6)-Id</i> ; <i>sul2</i> ; <i>tet(B)</i> ; <i>catA1</i> ; <i>mdf(A)</i> (mutace v <i>gyrA</i> a <i>parC</i> asociované s CIP rezistencí)	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> ; <i>aadA1</i> ; <i>aadA2b</i> ; <i>aph(3'')-Ib</i> ; <i>aph(3')-Ia</i> ; <i>aph(6)-Id</i> ; <i>cmlA1</i> ; <i>sul2</i> ; <i>sul3</i> ; <i>dfrA17</i> ; <i>tet(A)</i> ; <i>tet(B)</i> ; <i>mdf(A)</i> (mutace v <i>gyrA</i> , <i>parC</i> a <i>parE</i> asociované s CIP rezistencí)	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> ; <i>aph(4)-Ia</i> ; <i>aac(3)-IV</i> ; <i>aph(3'')-Ib</i> ; <i>aadA2</i> ; <i>aph(6)-Id</i> ; <i>mdf(A)</i> ; <i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tet(A)</i> , <i>dfrA15</i> (mutace v <i>gyrA</i> , <i>parC</i> a <i>parE</i> asociované s CIP rezistencí)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-27</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aadA2</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>mdf(A)</i> , <i>mph(A)</i> , <i>dfrA12</i> , <i>tet(A)</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-30</sub> , <i>mdf(A)</i> , <i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i> , <i>aadA1</i> , <i>dfrA1</i> (mutace v <i>gyrA</i> , <i>parC</i> a <i>parE</i> asociované s CIP rezistencí)	<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>mdf(A)</i> , <i>cmlA1</i> , <i>sul3</i> , <i>tet(A)</i> (mutace v <i>gyrA</i> , <i>parC</i> a <i>parE</i> asociované s CIP rezistencí)



## 5.2 Indukce kolistinové rezistence

U izolátů nesoucích gen *mcr-9* byl proveden test indukce kolistinové rezistence a stanovena hodnota MIC před a po indukčním testu. Stejný postup byl aplikován i na kontrolní skupinu izolátů bez nosičství genu *mcr-9*. Pro kontrolní skupinu byly vybrány izoláty stejných bakteriálních druhů jako v případě izolátů s geny *mcr-9*.

Nejdříve byly vybrány izoláty pozitivní v rámci analýzy PCR na přítomnost genu *mcr-9* s hodnotou MIC kolistinu  $\leq 2$  mg/l. Gen *mcr-9* byl u všech potvrzen pomocí Sangerova sekvenování, výsledek sekvenace ukazuje obrázek 12.



Obrázek 12: Příklad výsledku Sangerova sekvenování pro potvrzení přítomnosti genu *mcr-9*. Na obrázku je znázorněna výsledná sekvence pro čtyři izoláty (čtyři geny *mcr-9*) vyhodnocená v programu Geneious. Konsenzuální sekvence (nukleotidová a pod ní také aminokyselinová) je vyobrazena barevně nad sekvenovanými kmeny.

Konkrétně bylo analyzováno 12 izolátů uvedených v tabulce 21 původem ze sbírky bakterií testovaných na produkci širokospektrých betalaktamáz a/nebo karbapenemáz.

Tabulka 21: Kmeny pozitivní na přítomnost genu *mcr-9* v rámci analýzy PCR s potvrzením pomocí Sangerova sekvenování, které byly dále testovány na indukovatelnost kolistinové rezistence nízkými dávkami tohoto antibiotika.

\*Původní název *Enterobacter aerogenes*

ETR – endotracheální aspirát

Číslo kmene	Druh	Odebraný materiál	Datum izolace
46	<i>Enterobacter cloacae</i>	sputum	2011
117	<i>Citrobacter freundii</i>	moč	2013
142	<i>Klebsiella aerogenes</i> *	ETR	2013
235	<i>Enterobacter cloacae</i>	výtěr z rektu	2013
258	<i>Enterobacter cloacae</i>	moč	2013
322	<i>Enterobacter cloacae</i>	stěr z rány	2014
356	<i>Enterobacter cloacae</i>	moč	2015
372	<i>Enterobacter cloacae</i>	stolice	2015
378	<i>Enterobacter cloacae</i>	hemokultura	2016
384	<i>Enterobacter cloacae</i>	dutina ústní	2016
385	<i>Enterobacter cloacae</i>	výtěr z rektu	2016
468	<i>Enterobacter cloacae</i>	výtěr z rektu	2017



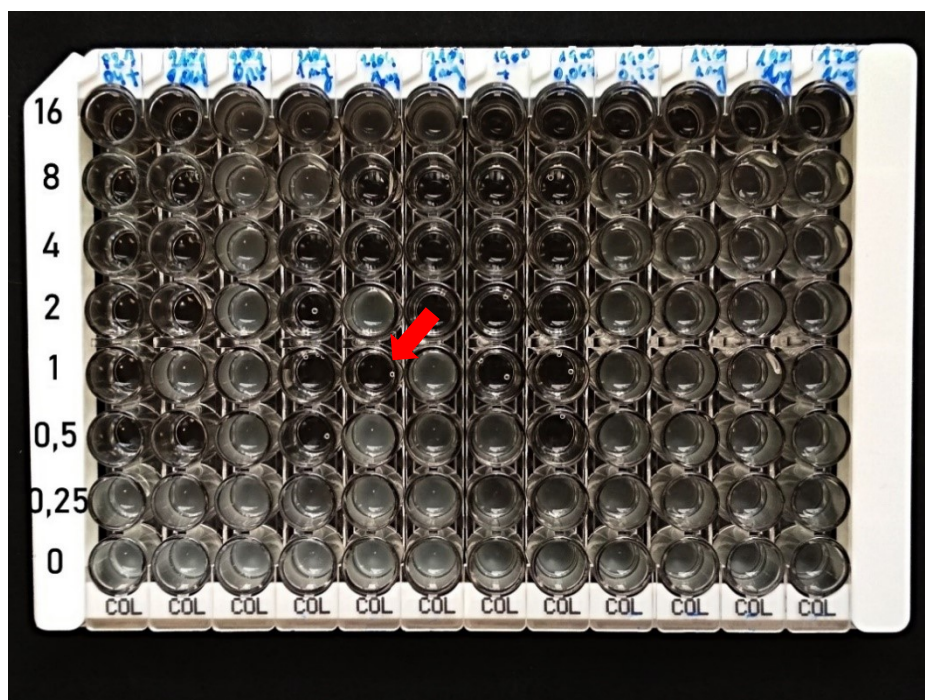
Gen *mcr-9* byl nalezen také u izolátu č. 309 (*Enterobacter cloacae*, izolovaný v roce 2014 z endotracheální kanyly, uvedený v kap. 5.1.4.3) a izolátu č. 316 (*Enterobacter aerogenes*, izolovaný v roce 2014 ze stěru z rány, uvedený v kap. 5.1.4.3), nicméně po provedení mikrodiluční metody pro testování rezistence ke kolistinu byla zjištěna kolistinová rezistence s hodnotou MIC >16 mg/l (izolát č. 309) a 8 mg/l (izolát č. 316). Proto byly izoláty z testování indukovatelnosti rezistence vyřazeny.

Citlivé izoláty byly vystaveny kolistinu o koncentraci 0,25; 0,5 a 1 mg/l. Koncentrace byly vybrány po vzoru studie provedené autory Kieffer et al., kteří vystavili izoláty subinhibičním, hraničně inhibičním i mírně vyšším koncentracím kolistinu, než je MIC kolistinu u daného kmene. Při výběru koncentrací byla také zohledněna skutečnost, že expozice vyšším dávkám kolistinu vedla ve zmíněné studii k vyššímu nárůstu MIC daného kmene (Kieffer et al. 2019). Po expozici kolistinu byl u pěti izolátů pozorován viditelný nárůst alespoň v jedné zmíněné koncentraci. Zbýlých sedm izolátů nenarostlo v žádné z koncentrací kolistinu. Zkumavky s médiem bez přídavku kolistinu a zkumavky obsahující médium s nejvyšší koncentrací kolistinu s viditelným zákalem byly centrifugovány a ze vzniklého peletu byla provedena mikrodiluční metoda pro testování citlivosti ke kolistinu. Sedm izolátů, které nenarostly v žádné ze zmíněných koncentrací antibiotika, dosahovalo maximální hodnoty MIC 0,5 mg/l, tedy dle očekávání byly kmeny citlivé.

Pět izolátů, které narostly alespoň v jedné zkumavce obohacené o kolistin, dosahovalo před testem indukce hodnoty MIC  $\leq 0,25$  mg/l, po vystavení nízkým dávkám kolistinu stoupla hodnota MIC u čtyř kmenů, u třech z nich nad hranici 2 mg/l, kdy už je kmen považován za rezistentní dle hodnot stanovených organizací EUCAST (EUCAST 2019). Kmen č. 258 opakovaně vyrostl za přítomnosti 0,25; 0,5 i 1 mg/l kolistinu, ačkoliv hodnota MIC zůstala beze změny. U daného kmene byl však v rámci mikrodiluční metody pro stanovení citlivosti opakovaně pozorovaný fenotyp přeskokování jamek (viz obrázek 13), který byl však překvapivě pozorovaný u kontroly, a nikoliv u vzorku vystavenému nízkým dávkám antibiotika. Hodnota MIC stanovená z nárůstu v kontrolní zkumavce bez kolistinu byla sice stanovena na  $\leq 0,25$  mg/l, nicméně byl opakovaně pozorovaný nárůst také ve vyšších koncentracích (nejčastěji při 1 mg/l), ačkoliv zbylé jamky zůstaly bez nárůstu. Možným vysvětlením by mohla být i kontaminace testovaného kmene, která je ale nepravděpodobná vzhledem k několika kontrolám během pokusů, kdy se ověřovala druhová identifikace kmene. Výjimkou je možnost kontaminace jiným kmenem stejného druhu s odlišnou citlivostí ke kolistinu, taková kontaminace by ale nevysvětlila fenomén přeskokování jamek. Indukovaný kmen (č. 258) však zůstal citlivý ke kolistinu s hodnotou MIC  $\leq 0,25$  mg/l.

Přehledný výsledek testu indukce shrnuje tabulka 22. Ke zvýšení MIC pomocí kultivace při nízkých dávkách kolistinu tedy došlo ve 33,3 % (4/12) případů při započtení všech kmenů a v 80,0 % (4/5) při započtení jen těch kmenů, které

vyrostly alespoň v jedné z testovaných koncentrací kolistinu. Šlo o následující kmeny: *Citrobacter freundii* (n = 1), *Klebsiella aerogenes* (n = 1), *Enterobacter cloacae* (n = 2). Dále 75 % (3/4) indukovaných izolátů dosahovalo po indukci hodnot MIC >2 mg/l, tedy je lze označit za rezistentní ke kolistinu.



Obrázek 13: Čísla vlevo určují koncentraci kolistinu v mg/l, kdy vrchní jamka obsahuje nejvyšší koncentraci (16 mg/l), zatímco spodní jamka s nulovou koncentrací slouží jako pozitivní kontrola růstu. Příklad fenotypu přeskakující jamky je zvýrazněn šipkou.

Tabulka 22: Přehled výsledků testu indukce u kmenů pozitivních na přítomnost genu *mcr-9*. Zvolené indukční koncentrace byly u všech kmenů stejné.

\*Byl patrný nárůst při koncentraci 1 mg/l kolistinu, viz obr. 13.

ETR – endotracheální aspirát

Číslo kmene	Druh	Odebraný materiál	Datum izolace	Pohlaví pacienta	Koncentrace kolistinu (mg/l)			MIC (mg/l)	
					0,25	0,5	1	Před indukci	Po indukci
46	<i>E. cloacae</i>	sputum	2011	M	neg	neg	neg	≤0,25	-
117	<i>C. freundii</i>	moč	2013	M	poz	neg	neg	≤0,25	16
142	<i>K. aerogenes</i>	ETR	2013	M	poz	poz	poz	≤0,25	2
235	<i>E. cloacae</i>	výtěr z rektu	2013	M	poz	poz	poz	≤0,25	16
258	<i>E. cloacae</i>	moč	2013	M	poz	poz	poz	≤0,25*	0,25
322	<i>E. cloacae</i>	stěr z rány	2014	M	poz	poz	poz	≤0,25	8
356	<i>E. cloacae</i>	moč	2015	Ž	neg	neg	neg	≤0,25	-
372	<i>E. cloacae</i>	stolice	2015	M	neg	neg	neg	≤0,25	-
378	<i>E. cloacae</i>	hemokultura	2016	M	neg	neg	neg	≤0,25	-
384	<i>E. cloacae</i>	dutina ústní	2016	Ž	neg	neg	neg	≤0,25	-
385	<i>E. cloacae</i>	výtěr z rektu	2016	Ž	neg	neg	neg	≤0,25	-
468	<i>E. cloacae</i>	rektum	2017	M	neg	neg	neg	0,5	-

Pro potvrzení hypotézy, že za indukci kolistinové rezistence je zodpovědný gen *mcr-9*, bylo vybráno devět izolátů ze sbírky bakterií testovaných na produkci širokospektrých betalaktamáz a/nebo karbapenemáz, které zůstaly na přítomnost genu *mcr-9* v rámci analýzy PCR negativní. Jejich výčet je uveden v tabulce 23.

Tabulka 23: Kmeny negativní na přítomnost genu *mcr-9* v rámci analýzy PCR, které byly dále testovány na indukovanost kolistinové rezistence nízkými dávkami tohoto antibiotika.

ETR – endotracheální aspirát

Číslo kmene	Druh	Odebraný materiál	Datum izolace
54	<i>Enterobacter cloacae</i>	stěr z trachey	2012
144	<i>Enterobacter cloacae</i>	sputum	2013
212	<i>Citrobacter freundii</i>	ETR	2013
237	<i>Enterobacter cloacae</i>	cévní katetr	2013
496	<i>Enterobacter cloacae</i>	výtěr z rektu	2017
510	<i>Klebsiella aerogenes</i>	moč	2017
532	<i>Enterobacter cloacae</i>	moč	2018
576	<i>Enterobacter kobei</i>	výtěr z pochvy	2018
612	<i>Enterobacter cloacae</i>	drén	2018

Izoláty byly stejně jako v předchozím případě vystaveny nízkým dávkám kolistinu o koncentraci 0,25; 0,5 a 1 mg/l a následně byla provedena mikrodiluční metoda pro testování citlivosti jak z kontroly, která neobsahovala kolistin, tak ze zkumavky s nejvyšší koncentrací kolistinu, ve které byl patrný bakteriální zákal. U pěti izolátů byl patrný zákal ve všech zmíněných koncentracích (izoláty č. 54, 144, 510, 576, 612), u izolátu č. 212 byl patrný zákal v koncentracích 0,25 a 1 mg/l, zbylé tři izoláty (č. 237, 496 a 532) zůstaly ke kolistinu citlivé ve všech koncentracích.

Po provedení mikrodiluční metody před indukčním testem byly všechny izoláty citlivé ke kolistinu s hodnotou MIC  $\leq 1$  mg/l. Po indukčním testu byla u pozitivních izolátů rostoucích alespoň v jedné ze zmíněných koncentrací kolistinu také provedena mikrodiluční metoda pro stanovení citlivosti. U všech šesti izolátů došlo ke zvýšení hodnoty MIC, u čtyř z nich (č. 212, 510, 576 a 612) se stal původně citlivý izolát rezistentním. Ke zvýšení MIC při expozici nízkým dávkám kolistinu tedy došlo v 66,7 % (6/9) při započtení všech kmenů a ve 100 % při započtení jen těch kmenů, které narostly alespoň v jedné z testovaných koncentrací kolistinu. Z toho 66,7 % (4/6) izolátů bylo po indukci ke kolistinu rezistentních.

Při opakování pokusů byly získány stejné výsledky. Přehledné shrnutí testu indukce shrnuje tabulka 24. Výsledky naznačují, že za nárůst kolistinové rezistence nebude zodpovědný pouze gen *mcr-9*, ale uplatňují se i jiné mechanismy.

Tabulka 24: Přehled výsledků testu indukce u kmenů negativních na přítomnost genu *mcr-9*.

\*Byl patrný nárůst při koncentraci 1 mg/l kolistinu

\*\*Nebyl patrný nárůst v jamkách obsahujících 0,5 mg/l kolistinu.

ETR – endotracheální aspirát

Číslo kmene	Druh	Odebraný materiál	Datum izolace	Pohlaví pacienta	Koncentrace kolistinu (mg/l)			MIC (mg/l)	
					0,25	0,5	1	Před indukci	Po indukci
54	<i>E. cloacae</i>	stěr z trachey	2012	M	poz	poz	poz	≤0,25*	2**
144	<i>E. cloacae</i>	sputum	2013	M	poz	poz	poz	≤0,25	1
212	<i>C. freundii</i>	ETR	2013	Ž	poz	neg	poz	≤0,25	16
237	<i>E. cloacae</i>	cévní katetr	2013	M	neg	neg	neg	≤0,25	-
496	<i>E. cloacae</i>	výtěr z rektu	2017	M	neg	neg	neg	≤0,25	-
510	<i>K. aerogenes</i>	moč	2017	Ž	poz	poz	poz	≤0,25	16
532	<i>E. cloacae</i>	moč	2018	M	neg	neg	neg	≤0,25	-
576	<i>E. kobei</i>	výtěr z pochvy	2018	Ž	poz	poz	poz	1	8
612	<i>E. cloacae</i>	drén	2018	M	poz	poz	poz	≤0,25	16

### 5.3 Stanovení růstové rychlosti

#### 5.3.1 Výběr izolátů

Pro zjištění, jaký vliv mají subinhibiční dávky kolistinu na bakteriální fitness a pro porovnání růstové rychlosti kmenů citlivých a rezistentních ke kolistinu, byla pomocí měření optické denzity na jednopaprskovém spektrofotometru stanovena doba zdvojení následujících kmenů *E. coli*:

1. KOL50/CCM 8874: referenční kmen pro testování antibiotické citlivosti, nesoucí gen *mcr-1* na plazmidu IncHI2 (Doumith et al. 2016),
2. KOL53/CCM 3954/ATCC 25922: referenční kmen pro antibiotickou citlivost, citlivý ke kolistinu,
3. KOL63: klinický kmen rezistentní ke kolistinu, nesoucí gen *mcr-1* na plazmidu IncX4,
4. KOL81: klinický kmen rezistentní ke kolistinu, bez genu *mcr*, nesoucí chromozomální mutaci dvousložkového systému PmrA/PmrB,
5. S340A: klinický kmen rezistentní ke kolistinu, nesoucí gen *mcr-1* na chromozomu,
6. P1301A: klinický kmen **citlivý** ke kolistinu, nesoucí gen *mcr-1* na plazmidu IncX4.

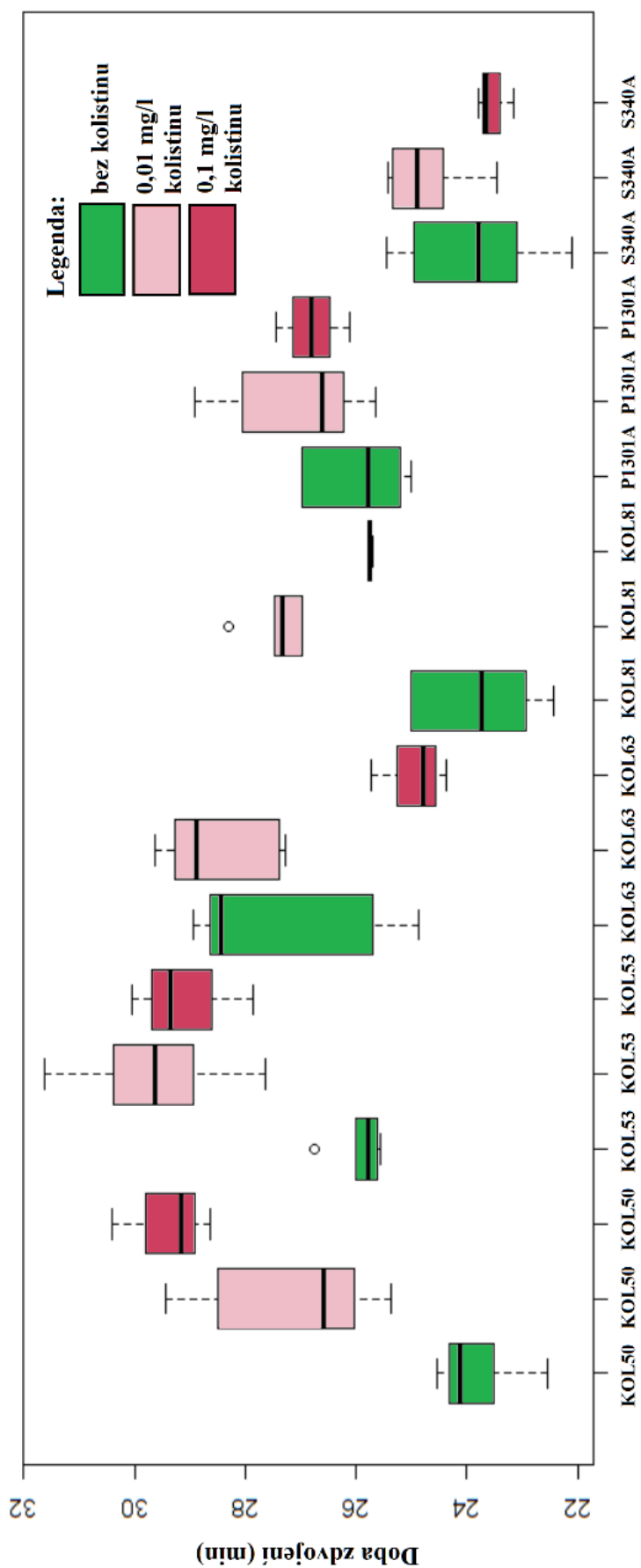
### 5.3.2 Výsledky porovnání růstové rychlosti

Bakteriální zákal byl měřen s hodinovým intervalem po dobu sedmi hodin, poslední vzorek byl odebrán po 24 hodinách od začátku kultivace. Kultivace probíhala jednak bez přítomnosti kolistinu, jednak za přítomnosti subinhibičních dávek kolistinu (0,01 a 0,1 mg/l, což představuje jednu setinu/desetinu MIC citlivého kmene KOL53). Koncentrace kolistinu byly zvoleny s ohledem na MIC testovaných kmenů a také distribuci hodnot MIC v klinických izolátech *E. coli*, kdy nebyl zaznamenán žádný izolát s MIC nižší než 0,01 mg/l a ojediněle izoláty s koncentrací nižší než 0,1 mg/l (EUCAST MIC Distribution Website, 2020). Všechny experimenty byly provedeny v triplikátu a zopakovány v nezávislém pokusu.

Doby zdvojení všech kmenů přehledně shrnuje tabulka 25. Z výsledků je patrné, že všechny kmeny rostou při expozici 0,01 mg/l kolistinu pomaleji. Při expozici vyšším dávkám kolistinu o koncentraci 0,1 mg/l rostou také téměř všechny kmeny pomaleji, výjimku tvoří kmeny KOL63 a S340A. Časy zdvojení všech testovaných kmenů přehledně shrnuje graf 5.

Tabulka 25: Přehled průměrných dob zdvojení všech testovaných kmenů v prostředí bez kolistinu a v prostředí se subinhibičními dávkami kolistinu (0,01 a 0,1 mg/l). Poslední dva sloupce ukazují rozdíly v dobách zdvojení testovaných kmenů. Záporné hodnoty představují zrychlení doby zdvojení oproti podmínkám kultivace bez expozice kolistinu.

Izolát	Doba zdvojení (čas)			Rozdíl od kultivace bez kolistinu (čas)	
	Bez kolistinu	0,01 mg/l kolistinu	0,1 mg/l kolistinu	0,01 mg/l kolistinu	0,1 mg/l kolistinu
KOL50	23 m 52 s	27 m 5 s	29 m 24 s	3 m 13 s	5 m 32 s
KOL53	25 m 55 s	29 m 38 s	29 m 5 s	3 m 43 s	3 m 10 s
KOL63	27 m 30 s	28 m 34 s	24 m 58 s	1 m 4 s	-2 m 33 s
KOL81	23 m 48 s	27 m 23 s	25 m 45 s	3 m 35 s	1 m 57 s
P1301A	25 m 57 s	27 m 1 s	26 m 47 s	1 m 4 s	50 s
S340A	23 m 52 s	24 m 44 s	23 m 31 s	52 s	-21 s



Graf 5: Časy zdvojení testovaných kmenů. Signifikantní rozdíl byl pozorován u vzorků KOL50, KOL53, KOL63 a KOL81.

Pro nalezení rozdílů v dobách zdvojení pro každý testovaný kmen kultivovaný za rozdílných podmínek i pro srovnání růstu jednotlivých kmenů byl použit Kruskal-Wallisův test. Hladina významnosti byla stanovena na hodnotu 0,05. Výsledky Kruskal-Wallisova testu souhrnně uvádí tabulky 26 a 27 a signifikantní výsledky jsou zvýrazněny červeně.

Tabulka 26: Výsledky Kruskal-Wallisova testu pro stanovení signifikantního rozdílu mezi dobami zdvojení u izolátů kultivovaných ve třech typech prostředí. Vždy byly porovnány tři doby zdvojení za různých kultivačních podmínek. Doby zdvojení jsou uvedeny v následujícím pořadí: bez přítomnosti kolistinu / za přidavku 0,01 mg/l kolistinu / za přidavku 0,1 mg/l kolistinu. Signifikantní rozdíly jsou zvýrazněny červeně.

Izolát	Doba zdvojení (čas)	p-hodnota
KOL50	23 m 52 s / 27 m 5 s / 29 m 24 s	0,003
KOL53	25 m 55 s / 29 m 38 s / 29 m 5 s	0,006
KOL63	27 m 30 s / 28 m 34 s / 24 m 58 s	0,041
KOL81	23 m 48 s / 27 m 23 s / 25 m 45 s	0,002
P1301A	25 m 57 s / 27 m 1 s / 26 m 47 s	0,256
S340A	23 m 52 s / 24 m 44 s / 23 m 31 s	0,239

Srovnání dob zdvojení u jednotlivých kmenů v tabulce 26 ukazuje signifikantní změnu v době zdvojení za přítomnosti kolistinu u většiny kmenů s výjimkou P1301A a S340A, u nichž přidání kolistinu nevedlo ke znatelné změně růstu. Rovněž srovnání napříč testovanými kmeny ukazuje, že se růstová rychlost testovaných kmenů za stejných podmínek signifikantně liší (viz tabulka 27).

Tabulka 27: Výsledky Kruskal-Wallisova testu pro stanovení signifikantního rozdílu mezi dobami zdvojení mezi testovanými kmeny kultivovanými za různých podmínek. Vždy byly porovnávány všechny kmeny za jednoho typu kultivačních podmínek. Pořadí testovaných kmenů a jejich dob zdvojení je následující: KOL50/KOL53/KOL63/KOL81/P1301A/S340A. Signifikantní rozdíly jsou zvýrazněny červeně.

Koncentrace kolistinu	Doba zdvojení (čas)	p-hodnota
Žádná	23 m 52 s / 25 m 55 s / 27 m 30 s / 23 m 48 s / 25 m 57 s / 23 m 52 s	0,000154
0,01 mg/l	27 m 5 s / 29 m 38 s / 28 m 34 s / 27 m 23 s / 27 m 1 s / 24 m 44 s	0,000199
0,1 mg/l	29 m 24 s / 29 m 5 s / 24 m 58 s / 25 m 45 s / 26 m 47 s / 23 m 31 s	0,007065

Největší rozdíl 5 minut 32 sekund byl pozorován u referenčního rezistentního kmene KOL50, který vykazoval výrazně pomalejší růst při vystavení vyšším dávkám kolistinu 0,1 mg/l oproti růstu bez přítomnosti kolistinu. Z toho plyne negativní vliv subletálních dávek antibiotika na růst tohoto kmene. Signifikantně pomalejší růst kmene



KOL50 byl pozorován i za přítomnosti nižší koncentrace kolistinu (0,01 mg/l), nicméně rozdíl byl méně výrazný (3 minuty 13 sekund oproti kultivaci v prostředí bez přídavku kolistinu). Podobné výsledky byly pozorovány také u druhého referenčního kmene KOL53 (citlivý ke kolistinu), který signifikantně zpomalil růst při kultivaci za přítomnosti antibiotika.

Signifikanční rozdíly mezi růstem bez přítomnosti antibiotika i za jeho přítomnosti byly pozorovány kromě referenčních kmenů KOL50 a KOL53 také u kmenů KOL63 (rezistentní ke kolistinu a nesoucí gen *mcr-1* na plazmidu IncX4) a KOL81 (rezistentní ke kolistinu, nesoucí chromozomální mutaci ve dvousložkovém systému PmrA/PmrB). Naopak nebyly pozorovány signifikantní rozdíly v růstu u citlivého izolátu P1301A, který nese defektní gen *mcr-1* na plazmidu IncX4, což se výrazně liší od referenčního kmene KOL53, který gen *mcr* postrádá. Signifikance nebyla pozorována ani u kmene S340A (rezistentní kmen, nesoucí gen *mcr-1* na chromozomu).

Výsledky signifikantní v rámci Kruskal-Wallisova testu byly dále podrobeny post hoc Tukeyho testu pro zjištění rozdílů mezi jednotlivými skupinami. Hladina významnosti byla i zde stanovena na hodnotu 0,05. Výsledky Tukeyho testu jsou shrnuty v tabulkách 28, 29, 30 a 31 a signifikantní rozdíly jsou zvýrazněny červeně.

Tabulka 28: Srovnání dob zdvojení jednotlivých izolátů v rámci rozdílných kultivačních podmínek s uvedenými *p*-hodnotami. Izoláty S340A a P1301A nebyly testovány, jelikož v rámci Kruskal-Wallisova testu nebyly vyhodnoceny jako signifikantní. Pořadí kultivačních podmínek a dob zdvojení je následující: bez kolistinu / 0,01 mg/l kolistinu / 0,1 mg/l kolistinu. Signifikanční rozdíly jsou zvýrazněny červeně.

Izolát a doby zdvojení (čas)	Srovnávané podmínky dle koncentrace kolistinu		
	Žádná / 0,01 mg/l	Žádná / 0,1 mg/l	0,01 mg/l / 0,1 mg/l
<b>KOL50</b> (23 m 52 s / 27 m 5 s / 29 m 24 s)	0,0013594	0,0000678	0,0413086
<b>KOL53</b> (25 m 55 s / 29 m 38 s / 29 m 5 s)	0,0001034	0,0022825	0,7311398
<b>KOL63</b> (27 m 30 s / 28 m 34 s / 24 m 58 s)	0,3872497	0,0475325	0,006449
<b>KOL81</b> (23 m 48 s / 27 m 23 s / 25 m 45 s)	0,0000099	0,0103172	0,0271034

Srovnání dob zdvojení jednotlivých kmenů v rámci rozdílných kultivačních podmínek ukázalo téměř ve všech případech signifikantní rozdíly v dobách zdvojení (viz tabulka 28). Výjimku tvořil citlivý referenční izolát KOL53, který rostl signifikantně pomaleji při expozici antibiotiku (ale již nezáviselo na jeho množství), a izolát KOL63 nesoucí gen *mcr-1* na plazmidu IncX4, který po přidání nízkých dávek kolistinu (0,01 mg/l) rostl srovnatelně rychle jako bez kolistinu.



Tabulka 29: Srovnání časů zdvojení mezi jednotlivými izoláty v prostředí bez přidavku kolistinu s uvedenými *p*-hodnotami. V závorce je uvedena doba zdvojení pro daný izolát. Signifikantní rozdíly jsou zvýrazněny červeně.

Bez kolistinu	KOL50 (23 m 52 s)	KOL53 (25 m 55 s)	KOL63 (27 m 30 s)	KOL81 (23 m 48 s)	P1301A (25 m 57 s)	S340A (23 m 52 s)
KOL50 (23 m 52 s)	-	0,0330648	0,0000453	0,9999994	0,0296265	1,0000000
KOL53 (25 m 55 s)	0,0330648	-	0,1644535	0,0270968	1,0000000	0,034085
KOL63 (27 m 30 s)	0,0000453	0,1644535	-	0,0000359	0,1793955	0,000047
KOL81 (23 m 48 s)	0,9999994	0,0270968	0,0000359	-	0,024237	0,9999987
P1301A (25 m 57 s)	0,0296265	1,0000000	0,1793955	0,024237	-	0,0305491
S340A (23 m 52 s)	1,0000000	0,034085	0,000047	0,9999987	0,0305491	-

Tabulka 30: Srovnání časů zdvojení mezi jednotlivými izoláty v prostředí s přidavkem kolistinu o koncentraci 0,01 mg/l s uvedenými *p*-hodnotami. V závorce je uvedena doba zdvojení pro daný izolát. Signifikantní rozdíly jsou zvýrazněny červeně.

0,01 mg/l	KOL50 (27 m 5 s)	KOL53 (29 m 38 s)	KOL63 (28 m 34 s)	KOL81 (27 m 23 s)	P1301A (27 m 1 s)	S340A (24 m 44 s)
KOL50 (27 m 5 s)	-	0,0056297	0,2340246	0,9963449	0,9999978	0,0132111
KOL53 (29 m 38 s)	0,0056297	-	0,5731736	0,0192985	0,0042549	0,0000003
KOL63 (28 m 34 s)	0,2340246	0,5731736	-	0,4849358	0,1935651	0,0000274
KOL81 (27 m 23 s)	0,9963449	0,0192985	0,4849358	-	0,9908126	0,003769
P1301A (27 m 1 s)	0,9999978	0,0042549	0,1935651	0,9908126	-	0,0172352
S340A (24 m 44 s)	0,0132111	0,0000003	0,0000274	0,003769	0,0172352	-

Tabulka 31: Srovnání časů zdvojení mezi jednotlivými izoláty v prostředí s přidavkem kolistinu o koncentraci 0,1 mg/l s uvedenými *p*-hodnotami. V závorce je uvedena doba zdvojení pro daný izolát. Signifikantní rozdíly jsou zvýrazněny červeně.

0,1 mg/l	KOL50 (29 m 24 s)	KOL53 (29 m 5 s)	KOL63 (24 m 58 s)	KOL81 (25 m 45 s)	P1301A (26 m 47 s)	S340A (23 m 31 s)
KOL50 (29 m 24 s)	-	0,9930445	0,0000729	0,0004728	0,0077651	0,000004
KOL53 (29 m 5 s)	0,9930445	-	0,0001508	0,0010672	0,0192915	0,0000073
KOL63 (24 m 58 s)	0,0000729	0,0001508	-	0,7552239	0,0734216	0,2146571
KOL81 (25 m 45 s)	0,0004728	0,0010672	0,7552239	-	0,5107939	0,0239975
P1301A (26 m 47 s)	0,0077651	0,0192915	0,0734216	0,5107939	-	0,0013024
S340A (23 m 31 s)	0,000004	0,0000073	0,2146571	0,0239975	0,0013024	-

Signifikantně rychleji než izolát nesoucí gen *mcr-I* na plazmidu IncX4 (KOL63) rostly v prostředí bez kolistinu izoláty rezistentní ke kolistinu nesoucí chromozomální mutaci, nebo izoláty nesoucí gen *mcr-I* na chromozomu (KOL81 a S340A). Izolát s genem *mcr-I* na plazmidu IncX4 (KOL63) však rostl při expozici kolistinu o koncentraci 0,1 mg/l výrazně rychleji než v prostředí s nižší nebo žádnou koncentrací kolistinu. Kmen tedy vykazoval selekční výhodu (vyšší růstovou rychlost) pouze v prostředí obsahujícím kolistin (a pravděpodobně čím vyšší dávka antibiotika je přítomna, tím větší je i selekční výhoda). Při testování růstové zdatnosti v prostředí bez kolistinu však byl u kmene KOL63 pozorován velký růstový rozptyl, což může vést ke zkresleným výsledkům. Stejně tak bylo pozorováno, že při expozici 0,1 mg/l kolistinu rostl signifikantně rychleji rezistentní izolát obsahující chromozomální mutaci (KOL81) oproti sbírkovému kmeni KOL50, který nese gen na plazmidu IncHI2.

Izolát KOL63 sice vykazoval signifikantně rychlejší růst za přítomnosti 0,1 mg/l kolistinu oproti růstu v prostředí s 0,01 mg/l kolistinu, nicméně rostl signifikantně pomaleji než rezistentní referenční kmen KOL50, avšak pouze v prostředí bez přídavku antibiotika. Za přítomnosti vyšší dávky antibiotika byl pozorován opačný jev. Čím vyšší koncentrace antibiotika byla v médiu přítomna, tím pomaleji referenční kmen rostl, naopak klinický izolát KOL63 svou růstovou rychlost zvýšil. Kmen KOL81 s chromozomální mutací dvousložkového systému PmrA/PmrB rostl při expozici antibiotiku sice pomaleji, nicméně vyšší dávka antibiotika měla menší vliv na růst než dávka nižší. U kmene S340A, který nese gen *mcr-I* na chromozomu, nebyl pozorován signifikantní rozdíl v růstu v prostředí s kolistinem nebo bez něj. Stejně tak nebyl pozorován výrazný rozdíl v růstu u kmene P1301A, který sice nese gen *mcr-I* na plazmidu, ale ke kolistinu je citlivý z důvodu inaktivace genu *mcr-I*.

Rozdíl mezi citlivými kmeny navzájem (KOL53 a P1301A) nebyl pozorován v prostředí bez přídavku kolistinu, nicméně byl zaznamenán rychlejší růst citlivého izolátu izolovaného z klinického materiálu (P1301A) oproti citlivému referenčnímu izolátu (KOL53) v prostředí obohaceném o kolistin. Jako nejvíc životaschopný se pak jevil izolát S340A nesoucí gen *mcr-I* na chromozomu, jelikož na jeho růstovou rychlost nemá koncentrace antibiotika významný vliv a za všech podmínek roste podobně, přičemž vykazuje vyšší růstovou rychlost než ostatní testované kmeny.

### 5.3.3 Celogenomové sekvenování

Pro testování schopnosti růstu byly vybrány kromě referenčních kmenů (KOL50 a KOL53) také kmeny, u kterých byla provedena celogenomová sekvenace v rámci studie bezpříznakového nosičství (P1301A, KOL63 = P732A, viz kap. 5.1.5) či v rámci studie u pacientů s cestovatelskou anamnézou (S340A, viz kap. 5.1.5). U kmene KOL81 byla

pro účely studie růstové křivky také provedena celogenomová sekvenace, jejíž výsledky shrnuje tabulka 32.

Tabulka 32: Výsledky celogenomové sekvenace izolátu KOL81, u kterého nebyl detekován gen *mcr*. ST: sekvenční typ dle Achtmanova MLST schématu / Pasteurova institutu, cgST: sekvenční typ pro metodu core genome MLST, MIC: minimální inhibiční koncentrace.

AMP – ampicilin; AMS – ampicilin/sulbactam; CFZ – cefazolin; CPZ – cefoperazon.

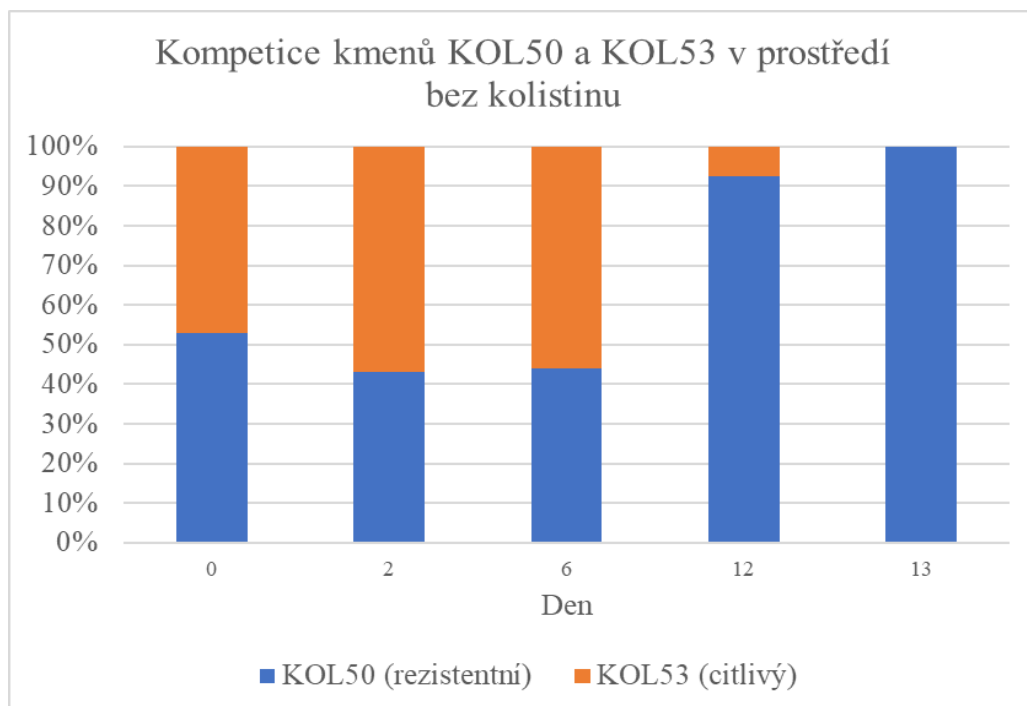
\*Byly detekované geny rezistence, ale nebyly testovány korespondující antibiotika: *mdf(A)* – makrolidy; *aadA1* – streptomycin, spectinomycin.

Izolát	Druh	Rok izolace	cgST	ST	MIC kolistinu (mg/l)	Mutace spojené s kolistinovou rezistencí	Detekované plazmidy	Další zjištěné rezistence k antimikrobiálním látkám	Geny antimikrobiální rezistence*
KOL81	<i>E. coli</i>	2019	6622	404 /6	>16 mg/l	<i>pmrB</i> (H2R, E123D, D283G, V351I), <i>pmrA</i> (T31S, I128N, G144S)	Col(BS512, Col156, IncFIB(AP001918), IncFII	AMP, AMS, CFZ, CPZ	<i>bla</i> <sub>TEM-1A</sub> , <i>aadA1</i> , <i>mdf(A)</i> , <i>dfrA</i>

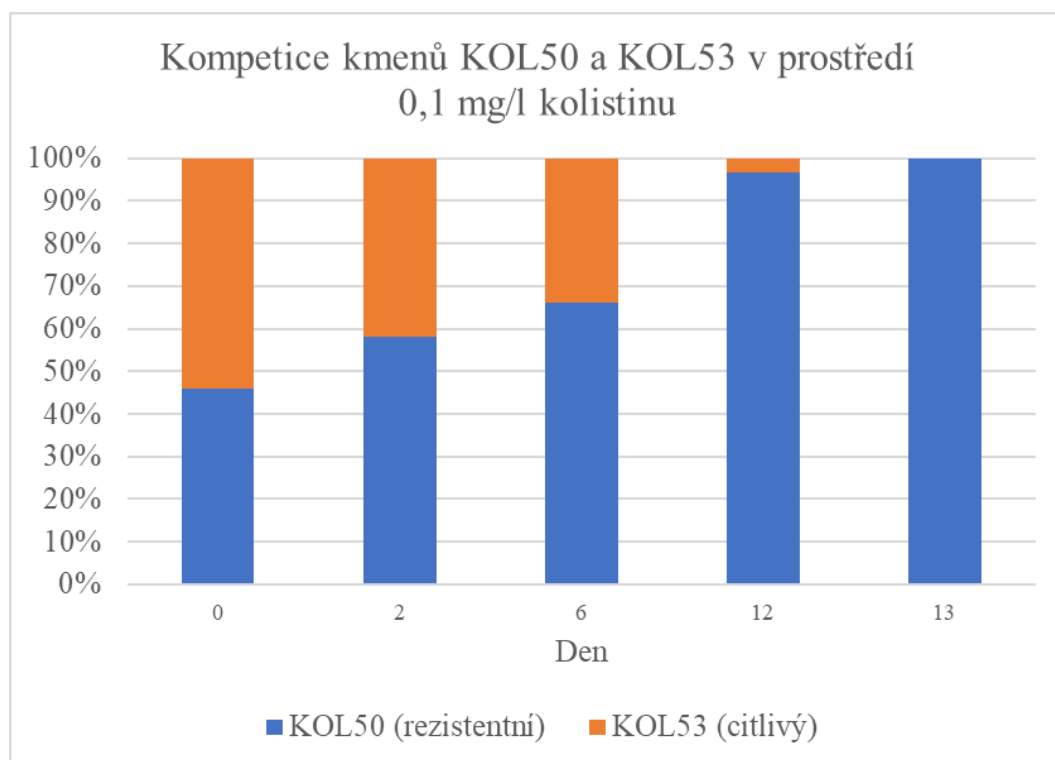
#### 5.4 Stanovení schopnosti kompetice

Pro testování kompetiční zdatnosti byl vybrán referenční kmen KOL53 citlivý ke kolistinu, u něhož byla sledována kompetice proti referenčnímu kmenu KOL50 rezistentnímu ke kolistinu, nesoucímu gen *mcr-1* na plazmidu IncHI2 (Doumith et al. 2016). Kompetiční zdatnost byla sledována do chvíle, kdy jeden kmen zcela převážil nad kmenem druhým, tedy po dobu 13 dnů. Dvojice kmenů byly umístěny do prostředí bez kolistinu a do prostředí s přidavkem 0,1 mg/l kolistinu (desetina MIC citlivého kmene KOL53). Z výsledných grafů (graf 6 a 7) je patrné, že v obou případech převládl rezistentní kmen KOL50 nesoucí na plazmidu gen *mcr-1*.

Pro ověření, jestli expozice subletálními dávkami kolistinu nevedla ke vzniku rezistence u citlivého kmene, byly kolonie rostoucí na kolistinových plotnách vysety na plotny obohacené o ampicilin, ke kterému byl rezistentní pouze kmen KOL50 (rezistentní ke kolistinu). Výsledky kultivace obou kmenů na plotnách obohacených o ampicilin o koncentraci 50 mg/l média ukázaly nárůst ve všech případech, tedy nebyla detekována žádná kolonie, která by byla citlivá k ampicilinu.



Graf 6: Výsledek kultivace citlivého kmene KOL53 a ke kolistinu rezistentního kmene KOL50 v prostředí bez přídavku kolistinu. Po 13 dnech zcela převládl rezistentní kmen KOL50.



Graf 7: Výsledek kultivace citlivého kmene KOL53 a ke kolistinu rezistentního kmene KOL50 v prostředí obohaceném o kolistin v koncentraci 0,1 mg/l. Po 13 dnech zcela převládl rezistentní kmen KOL50.

## 6 Diskuze

Objev plazmidově vázané rezistence ke kolistinu znamená globální ohrožení pro používání tohoto antibiotika jako rezervy při léčbě těžkých infekcí způsobených multirezistentními gramnegativními bakteriemi (Liu et al. 2016). V rámci projektu jsem se proto zaměřila na mapování výskytu kolistinové rezistence v České republice. Vzorky byly analyzovány na Ústavu lékařské mikrobiologie Fakultní nemocnice v Motole a na vyšetřování se podílel tým laboratoře molekulární mikrobiologie. Jedná se o první studii, ve které byla analyzována přítomnost devíti popsanych genů *mcr* (*mcr-1* až *mcr-9*). Pro studium nosičství genů *mcr-1* až *mcr-9* v gastrointestinálním traktu byla použita modifikovaná metodika publikovaná autory Schaumburg et al., kteří pro přímou detekci genů *mcr* využili kombinaci kultivace na selektivním agaru (Superpolymyxin™) následovanou PCR detekcí genů *mcr* u gramnegativních izolátů rezistentních ke kolistinu (Schaumburg et al. 2019). V rámci řešení projektu byla tato metodika obohacena o noční kultivaci primárního vzorku v pomnožovacím médiu dle publikace vydané autory Bernasconi et al. To dovolilo přímou detekci genů *mcr* z pomnožení v porovnání s primárním vyšetřením na selektivních plotnách, který umožnil záchyt pouze rezistentních izolátů. Autoři pomocí metody PCR detekovali nosičství genu *mcr-1* pouze v pomnožené kultuře (Bernasconi et al. 2016). Kombinací obou metod bylo docíleno záchytu nejen rezistentních izolátů, ale i těch, které nesou inaktivovaný gen *mcr-1*, a tak by na selektivní plotně nenarostly (v případě pozitivní PCR detekce z pomnožení byla použita půda bez přídavku kolistinu). Stejně tak byly detekovány izoláty nesoucí gen *mcr-1* z pomnožení negativního v rámci PCR, což mohlo být způsobeno inhibicí PCR či koncentrací produktu pod detekčním limitem metody.

Do objevu plazmidově vázané kolistinové rezistence se citlivost ke kolistinu stanovovala standardně diskovou difuzní metodou, která je pro svou nízkou cenu a jednoduché provedení nejčastější metodou testování citlivosti k antibiotikům, nicméně bylo prokázáno, že validní výsledky citlivosti ke kolistinu poskytuje pouze metoda mikrodiluční (Matuschek et al. 2017). U izolátů pozitivních na nosičství genů *mcr* je důležité používat spolehlivou metodu testování rezistence, jelikož tyto izoláty (na rozdíl od izolátů s chromozomálně vázanou rezistencí ke kolistinu) často vykazují nízkou hodnotu MIC (Dortet et al. 2018; Wu et al. 2018; Luo et al. 2017), což zvyšuje riziko falešně citlivého výsledku při použití diskové difuzní metody. Vzhledem k vyšší ceně mikrodiluční metody oproti diskové difuzní se však hodnota MIC kolistinu běžně stanovuje pouze u klinicky významných izolátů (např. při sepsi), a údaje o výskytu kolistinové rezistence tak mohou být značně zkreslené a neúplné.

V předkládaném projektu bylo mezi vzorky od hospitalizovaných pacientů, cestovatelů, mezi klinickými izoláty vykazujícími rezistenci ke kolistinu i vzorky ze sbírky enterobakterií testovaných na produkci širokospektrých betalaktamáz a/nebo karbapenemáz objeveno celkem osm různých izolátů, u nichž byla prostřednictvím PCR v reálném čase s následnou konfirmací pomocí Sangerova sekvenování prokázána přítomnost genu *mcr-1*. Pět izolátů pocházelo ze studie bezpříznakového nosičství, dva izoláty byly získány od pacientů s cestovatelskou anamnézou a ve třech případech šlo o klinické izoláty vykazující rezistenci ke kolistinu, nicméně z toho ve dvou případech byly získány odpovídající izoláty od stejných pacientů také v rámci studie bezpříznakového střevního nosičství. Ve všech osmi případech se jednalo o izoláty *Escherichia coli*, která je také dle jiných studií nejčastějším nositelem genu *mcr-1* (Quan et al. 2017; Yang Wang et al. 2017; Saavedra et al. 2017; Yoon et al. 2018). Dále bylo získáno celkem 14 izolátů pozitivních na přítomnost genu *mcr-9*, přičemž ale převážná část izolátů zůstala ke kolistinu citlivá (85,7 % citlivých izolátů). Nositeli byly převážně kmeny z rodu *Enterobacter* spp. (85,7 %), což je ve shodě s jinými studiemi (Yuan et al. 2019; Chavda et al. 2019). V menší míře pak byly zachyceny izoláty *Klebsiella* spp. a *Citrobacter* spp. (14,3 %).

#### 6.1 Studie bezpříznakového střevního nosičství u hospitalizovaných pacientů

V rámci prospektivní studie bezpříznakového nosičství zpracované v této diplomové práci bylo analyzováno 1922 vzorků. Pro vyšší záchyt byla pomocí PCR analyzována všechna pomnožení přímou detekcí genu *mcr* (na kultivaci nezávislé) i rezistentní izoláty získané kultivačně na selektivním médiu. Jedná se tak o první studii analyzující přítomnost genů *mcr-1* až *mcr-8*. Z celkového počtu 1922 výtěrů z rektu a vzorků stolic byla rezistence ke kolistinu potvrzena mikrodiluční metodou u 131 izolátů pocházejících ze 128 vzorků. Pět vzorků obsahovalo izoláty nesoucí gen *mcr-1*. Prevalence rezistence ke kolistinu tak činí 6,7 % (128/1922) vzorků. Celková prevalence nosičství enterobakterií obsahujících gen *mcr-1* činí 0,26 % (5/1922) vzorků od pacientů bez příznaků střevní infekce. V roce 2018 byly zachyceny dva izoláty (0,19 %, 2/1055) a v roce 2019 tři izoláty (0,35 %, 3/867) nesoucí gen *mcr-1*. Celková prevalence nosičství genu *mcr-1* mezi rezistentními izoláty činí 3,1 % izolátů (4/131, zde je nutné vynechat citlivý izolát P1301A izolovaný v roce 2019), za rok 2018 jde o 2,9 % izolátů (2/70) a za rok 2019 3,3 % izolátů (2/61). Uvedené hodnoty ukazují mírný nárůst výskytu genu *mcr* v čase, nicméně vzhledem k nízkým počtům v obou obdobích je rozdíl spíše stochastický.

Podobná studie střevního nosičství byla provedená také ve Slovinsku, kde byly v roce 2019 analyzovány vzorky rektálních výtěrů a tracheálních aspirátů na přítomnost

enterobakterií rezistentních ke kolistinu. Autoři celkem vyšetřili 739 vzorků od 330 pacientů a od 31 (9,4 %) pacientů získali 45 izolátů rezistentních ke kolistinu zahrnující izoláty *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* a rody *Enterobacter* spp. a *Citrobacter* spp. Žádný izolát nenesl gen *mcr-1* a nebyly detekovány ani geny *mcr-2* až *mcr-5*. Přes drobné odlišnosti jsou výsledky této studie srovnatelné s výsledky této diplomové práce (Germ et al. 2019).

Autoři pařížské studie z roku 2017 pak analyzovali vzorky stolice pacientů šesti pařížských nemocnic na přítomnost kolistinové rezistence u izolátů *E. coli*. Záchyt rezistentních izolátů byl stejně jako v případě slovinské studie vyšší ve srovnání s výsledky této studie. Z celkového počtu 1217 pacientů bylo nalezeno 153 rezistentních izolátů izolovaných ze 152 pacientů, což činí 12,5 % vzorků. Nicméně oproti naší studii bylo detekováno více rezistentních izolátů nesoucích gen *mcr-1* (7 ze 153 izolátů, tedy 4,6 % izolátů rezistentních ke kolistinu). Stejně jako v tomto projektu nebyla autory francouzské studie detekována přítomnost genu *mcr-2* až *mcr-8*. U izolátů s *mcr-1* byla často pozorována rezistence ke kotrimoxazolu a tetracyklinu (v obou případech 6 ze 7 izolátů bylo rezistentních), ale nikoliv ke karbapenemům (žádný izolát nebyl rezistentní), což je opět ve shodě s touto studií. Výsledky jsou tak přes malé odlišnosti srovnatelné se zjištěními tohoto projektu (Bourrel et al. 2019). Jiná francouzská studie z roku 2016 analyzovala rektální výtěry na prevalenci rezistence ke kolistinu u gramnegativních tyčiek. Po vyřazení přirozeně rezistentních izolátů byla zaznamenána prevalence získané kolistinové rezistence 1,4 % (9 izolátů z 653 vzorků), což je výrazně méně než ve studii provedené Bourrel et al. z roku 2017. Gen *mcr-1* a *mcr-2* navíc nebyl detekován u žádného izolátu (Saly et al. 2017). Studie analyzující prevalenci kolistinové rezistence mediované genem *mcr-1* mezi enterobakteriemi izolovanými ze stolice pacientů terciární péče v Nizozemsku pak ukázala také relativně nízkou prevalenci 0,35 % pacientů nesoucích izolát s *mcr-1* (2 z 576). Jeden z izolátů byl navíc stejně jako v této studii citlivý ke kolistinu ( $MIC \leq 0,25$  mg/l) pro výskyt transpozonu *IS10R*, který byl na základě celogenomové sekvenace nalezen uvnitř genu *mcr-1*. Oproti izolátu P1301A detekovaném v této studii byl rezistentní k některým typům betalaktamových antibiotik (ampicilin, cefuroxim, cefotaxim, ceftazidim) a kotrimoxazolu, nicméně stejně jako izolát P1301A byl rezistentní k ciprofloxacinu a tetracyklinu. Oba izoláty zůstaly kromě kolistinu citlivé k cefepimu, gentamicinu, meropenemu a tobramycinu (Terveer et al. 2017). Studie zkoumající vzorky stolic a rektálních výtěrů ve Švýcarsku pak zaznamenala prevalenci výskytu enterobakterií rezistentních ke kolistinu 1,5 % u zdravých jedinců (16 z 1091 pacientů) a 3,8 % u pacientů primární péče

(2 z 53 pacientů), nicméně u žádného izolátu nebyla detekována přítomnost genu *mcr-1* nebo *mcr-2* (Zurfluh et al. 2017).

Analýza prevalence nosičství genu *mcr-1* ve stolici v Singapuru v roce 2017 zaznamenala nečekaně vysokou prevalenci 6 % (12/201 vzorků), což však může být způsobeno specifickým výběrem vzorků (pouze průjemová stolice, která může souviset s rizikovými, dlouhodobě hospitalizovanými pacienty). Stejně jako v této studii však šlo o izoláty citlivé ke karbapenemům a největší záchyt byl u druhu *E. coli* (11 izolátů), pouze v jednom případě se jednalo o *K. pneumoniae* (La et al. 2019). Vysoká prevalence může být způsobena také životním stylem a kontaktem s farmářskými zvířaty. Srovnáním střevního nosičství izolátů s genem *mcr-1* u drůbeže, farmářů pracujících na drůbežích farmách, obyvatelů vesnic nepracujících na drůbežích farmách a obyvatelů měst se zabývala vietnamská studie z roku 2017. Ta ukázala vyšší prevalenci nosičství izolátů s genem *mcr-1* u farmářů pracujících s drůbeží kolonizovanou bakteriemi nesoucími gen *mcr-1* (33 %, 29 pozitivních vzorků z 88) v porovnání s obyvateli měst a i obyvateli vesnic nepracujícími na drůbežích farmách (9,1 %, 8/88 u obyvatelů měst a 17,9 %, 31/173 u obyvatelů vesnic) a také v porovnání s farmáři pracujícími s drůbeží negativní na přítomnost tohoto genu (17,6 %, 16/91) (Trung et al. 2017). K podobným závěrům dospěla také bolivijská studie z roku 2018, která se zabývala výskytem enterobakterií s geny *mcr-1* a *mcr-2* ve stolici zdravých dětí bydlících na vesnici. V této studii byla objevena nezvykle vysoká prevalence nosičství genu *mcr-1*. Z 337 dětí neslo alespoň jeden izolát s genem *mcr-1* 129 z nich (38,3 % dětí). Ze 129 vzorků bylo izolováno 173 izolátů s genem *mcr-1*, gen *mcr-2* nebyl detekován. Opět se jednalo ve většině případů o *E. coli* (98,8 %, 171 izolátů), v jednom případě šlo o *Citrobacter europaeus* a *Enterobacter hormaechei*. Všech 171 izolátů *E. coli* bylo citlivých ke karbapenemům i tigecyklinu. Vzhledem k tomu, že šlo o zdravé jedince (pouze čtyři z nich byli v minulosti léčeni antibiotiky), se nabízí jako vysvětlení vysoké prevalence blízký kontakt se zvířaty a nižší úroveň hygieny. V Bolívii se kolistin v humánní sféře využívá pouze za účelem léčby těžkých infekcí způsobených multirezistentními patogeny, tudíž jeho užívání v humánní medicíně je významně omezováno. Naopak ve veterinární medicíně a zemědělství je kolistin stále využíván, což může mít za důsledek selekci bakterií rezistentních ke kolistinu v životním prostředí i u hospodářských zvířat, se kterými jsou obyvatelé vesnic v bližším kontaktu (Giani et al. 2018; Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad Alimentaria 2018).

Pro zjištění, zda má používání kolistinu jako růstového faktoru vliv na výskyt plazmidově vázané kolistinové rezistence, byla v roce 2020 provedena komparativní studie v Číně. Bylo zjištěno, že před zákazem užívání kolistinu jako růstového faktoru



byl nález střevního nosičství *E. coli* nesoucích gen *mcr-1* u 14,3 % pacientů čínských nemocnic (644 pozitivních vzorků z 4498) oproti 6,3 % pozitivních vzorků (357/5657) získaných poté, co bylo právně zakázáno používat kolistin jako růstový faktor. S uvedeným koresponduje i snížení střevního nosičství bakterií rezistentních ke kolistinu u prasat a drůbeže po zákazu využívání kolistinu jako růstového faktoru. V prasečí stolici bylo před zákazem zachyceno 34 % pozitivních vzorků (1153/3396) oproti 5,1 % (142/2871) po zákazu. Obdobný pokles byl zaznamenán i v drůbeží stolici, kdy před zákazem bylo nalezeno 18,1 % pozitivních vzorků (474/2614) oproti situaci po zákazu s hodnotou 5 % (143/2887) (Wang et al. 2020). Podobná studie provedená ve stejném roce v Číně došla k obdobným závěrům. Po zákazu užívání kolistinu jako růstového faktoru klesla prevalence střevního nosičství izolátů s genem *mcr-1* u zdravých dobrovolníků z 21 % (238/1120) na 0,8 % (8/1020). Pokles byl pozorovatelný i u střevního nosičství *mcr-1* u prasat, kde z počáteční hodnoty 76 % (271/355) klesl počet pozitivních vzorků na 24 % (205/861) (C. Shen et al. 2020). Uvedené závěry naznačují, že využívání kolistinu v zemědělství má významný dopad i na střevní nosičství enterobakterií rezistentních ke kolistinu u lidí, kteří mohou být kolonizováni, aniž by došlo k předchozí expozici tomuto antibiotiku.

Výsledky grantového projektu, během kterého vznikla také tato diplomová práce, odpovídají studiím z jiných evropských států popsaných výše, naopak v zemích s vyšší mírou spotřeby kolistinu v zemědělství je situace méně příznivá. Všechny pozitivní izoláty byly zachyceny ve vzorcích výtěru z rektu a pocházely z různých oddělení. Ve všech pěti případech se jednalo o druh *E. coli*. Dva kmeny z roku 2018 dosahovaly hodnot MIC 8 mg/l, dva izoláty z roku 2019 pak 4 mg/l a jeden izolát byl ke kolistinu citlivý. Citlivý izolát byl zachycen díky přímému průkazu genů *mcr* přímo z pomnožení v tekutém médiu s následnou kultivací na neselektivním médiu. Toto zjištění zdůrazňuje potřebu analýzy PCR mezi rezistentními izoláty v kombinaci s přímou detekcí genů *mcr* pomocí PCR pro zachyt tichého přenosu genů *mcr* u citlivých izolátů. Hodnoty MIC byly ve všech případech spíše nižší ( $\leq 8$  mg/l), což se při srovnání s jinými studiemi jeví jako typické pro rezistenci způsobenou geny *mcr-1* (Dortet et al. 2018; Wu et al. 2018; Luo et al. 2017). Naopak kolistinová rezistence způsobená chromozomálními mutacemi, případně rezistence způsobená genem *mcr* lokalizovaným na chromozomu, dosahuje typicky i vyšších hodnot (Wu et al. 2018; Jayol, Nordmann, et al. 2017).

Ve třech případech (P642A, P732A, P1301A) byl jako nositel genu *mcr-1* detekován plazmid IncX4, což je jeden z nejčastějších plazmidů zodpovědných za globální šíření horizontálně přenosné rezistence ke kolistinu (Q. Wang et al. 2017). Dva izoláty (P1519A, P1622A) obsahovaly gen *mcr-1* na plazmidu IncHI2, který je také

častým nositelem genu *mcr-1*, některé studie ale naznačují, že na rozdíl od IncX4 nosičství plazmidu IncHI2 snižuje hostitelovo fitness, což může být příčinou, proč se vyskytuje méně často (Wu et al. 2018; Ma, Feng a Zong 2018). Geny *mcr-2* až *mcr-8* nebyly v této studii detekovány, což koreluje s nízkým nebo žádným záchytem i v rámci jiných studií, jejichž autoři detekovali jejich výskyt spíše mezi zvířecími izoláty (Liassine et al. 2016; Y Wang et al. 2020; Nang, Li a Velkov 2019; Nabti et al. 2019).

Z uvedeného plyne, že plazmidově vázaná rezistence ke kolistinu u lidí je nejčastěji mediována geny *mcr-1* a nejčastějšími nositeli jsou bakterie *E. coli*. Nízká prevalence však naznačuje, že ačkoliv je zde potenciální riziko horizontálního genového transferu, nepředstavuje prozatím kolistinová rezistence způsobená geny *mcr* v České republice vážnější zdravotní riziko. Problémem však může být tichý přenos genů *mcr* mezi citlivými izoláty, což vyzdvihuje nutnost neomezovat PCR detekci těchto genů jenom na rezistentní izoláty, ale také testovat přítomnost těchto genů přímo v klinických vzorcích nebo ve vzorcích z prostředí.

## 6.2 Izoláty od pacientů s cestovatelskou anamnézou

Mezi zdravými cestovateli byla v rámci diplomové práce zaznamenána prevalence nosičství genu *mcr-1* ve stolici 1,1 %. V porovnání s jinými studiemi byla pozorována nižší prevalence než u nizozemských a německých cestovatelů v letech 2016 až 2018 (11,4 %, 15/132) (Schaumburg et al. 2019) a u nizozemských cestovatelů na velké vzdálenosti mezi roky 2001 až 2012 (4,9 %, 6/122) (Wintersdorff et al. 2016). Další studie zkoumající výskyt rezistence ke kolistinu mediované genem *mcr-1* ve vzorcích stolice od cestovatelů se primárně zaměřovaly na bakterie produkující betalaktamázy širokého spektra (ESBL). V rámci studie provedené autory Nakayama et al. byly analyzovány vzorky japonských cestovatelů navštěvujících Vietnam a celkem byly mezi bakteriemi s produkcí ESBL detekovány tři izoláty pozitivní na přítomnost genu *mcr-1* (19 cestovatelů, 34 cest) (Nakayama et al. 2018). Podobná studie detekovala čtyři pozitivní izoláty mezi 38 cestovateli žijícími ve Švýcarsku a vracejícími se z Indie (Bernasconi et al. 2016) a taktéž byl detekován jeden pozitivní izolát mezi 175 švédskými cestovateli (Vading et al. 2016).

I v naší studii byly oba izoláty pozitivní na přítomnost genu *mcr-1* získané od cestovatelů multirezistentní a v jednom případě se jednalo o producenta ESBL (*bla*<sub>CTX-M-27</sub>). Ze studií dokumentujících přítomnost genu *mcr-1* u cestovatelů vyplývá, že nejrizikovější oblasti jsou Vietnam, Thajsko a Indie (Bernasconi et al. 2016; Nakayama et al. 2018; Vading et al. 2016). V rámci řešení projektu byla přítomnost genu *mcr-1* detekována u zdravých jedinců přechodně žijících v České republice s trvalým pobytem v Itálii a na Novém Zélandu. V Itálii byla přítomnost bakteriálních izolátů nesoucích gen

*mcr-1* zaznamenána v humánních vzorcích, dobytku i potravinách (Nang, Li a Velkov 2019). Na Novém Zélandu byl dosud popsán jeden klinický izolát *E. coli* rezistentní ke kolistinu a pozitivní na přítomnost genu *mcr-1* ve vzorku moči (Creighton et al. 2019). Zdrojem izolátů nesoucích geny *mcr* může být kromě cestovatelů také import zvířat a potravin z rizikových zemí, jak ukazuje studie, která v České republice detekovala rezistenci mediovanou genem *mcr-1* ve vzorcích masa pocházejících jak z českého trhu, tak ve vzorcích masa importovaného z různých zemí Evropské unie. Většina izolátů byla *E. coli* (Gelbicova et al. 2019).

U dvou izolátů *E. coli* získaných od cestovatelů v rámci tohoto projektu byl gen *mcr-1* lokalizován v jednom případě na chromozomu (S340A) uvnitř transpozonu Tn6330 a ve druhém případě na plazmidu typu IncX4 (S377A). Plazmid IncX4 bývá typicky velký kolem 35 kb, obvykle nese pouze rezistenci ke kolistinu a je jedním z nejčastějších nositelů genu *mcr-1*, který se podílí i na jeho globálním šíření (Matamoros et al. 2017). Lokalizace genu *mcr-1* na plazmidu je tedy běžná, zatímco chromozomální umístění bývá vzácné (Lu et al. 2019; Zhou et al. 2017). Chromozomálně umístěný gen *mcr-1* u izolátu S340A byl nalezen v rámci struktury IS*Apl1*-*mcr-1*-ORF-IS*Apl1*, který je známý jako transpozon Tn6330. Tato struktura je schopná tvorby cirkulárního intermediátu a následné translokace mezi plazmidem a chromozomem (R. Li et al. 2017, 2018). V tomto transpozonu může dojít ke ztrátě transpozázy IS*Apl1*, což vede k jeho stabilizaci uvnitř chromozomu (Nang, Li a Velkov 2019).

Je zjevné, že (obdobně jako v jiných studiích) určitá část českých cestovatelů nebo cizinců dočasně žijících v České republice může být kolonizována multirezistentními bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae* nesoucími gen kolistinové rezistence *mcr-1* na plazmidu nebo chromozomu, a může se tak podílet na šíření těchto multirezistentních bakterií. Ve srovnání se studií zaměřenou na bezpříznakové střevní nosičství u hospitalizovaných pacientů je prevalence rezistence ke kolistinu u cestovatelů mírně vyšší a byla pozorována také vyšší prevalence nosičství genu *mcr-1*, a to jak při započtení všech vzorků, tak při započtení pouze ke kolistinu rezistentních izolátů. Stejně jako je tomu u rezistence ke karbapenemům (Peirano et al. 2014), jsou cestovatelé (a zejména ti, kteří cestují do zemí s vysokým výskytem bakterií rezistentních ke kolistinu) rizikovou skupinou z hlediska šíření plazmidově vázané rezistence ke kolistinu.

### 6.3 Klinické izoláty s prokázanou rezistencí ke kolistinu

U klinických izolátů s prokázanou rezistencí ke kolistinu z různých klinických materiálů byla v této studii zjištěna prevalence nosičství genu *mcr-1* v 5,2 % (3/58) izolátů. Jiné studie zaměřující se na nosičství genů *mcr* mezi izoláty rezistentními ke kolistinu humánního původu detekovaly srovnatelnou prevalenci jako tato studie.

Částečně retrospektivní studie provedená Pomorskou et al. v České republice za období 2008 až 2018 zaznamenala nižší prevalenci nosičství genu *mcr* u klinických izolátů (1,6 %, 10/610) a detekován byl zejména gen *mcr-1* (8/10), v menší míře také gen *mcr-4* (2/10). MIC získaných izolátů nesoucích gen *mcr-1* dosahovala nejčastěji hodnoty 8 mg/l (62,5 %), zatímco izoláty nesoucí gen *mcr-4* dosahovaly vyšších hodnot MIC (>16) (Pomorská et al. 2018). Izoláty získané v rámci tohoto projektu dosahovaly hodnoty MIC 4 a 8 mg/l, tedy hodnot srovnatelných s výše zmíněnou studií. Uvedené hodnoty opět potvrzují skutečnost, že plazmidově vázaná rezistence ke kolistinu mediovaná genem *mcr-1* způsobuje spíše nižší hodnotu MIC (4 až 8 mg/l) (Dortet et al. 2018; Wu et al. 2018; Luo et al. 2017).

U získaných izolátů nesoucích gen *mcr-1* byla provedena také mikrodiluční metoda pro stanovení citlivosti k jiným typům antibiotik. Izoláty vykazovaly kromě kolistinu také rezistenci k několika betalaktamovým antibiotikům (ampicilin, ampicilin v kombinaci se sulbaktamem, cefazolin, piperacilin), kotrimoxazolu, ciprofloxacinu a tetracyklinu. Izolát KOL82 byl rezistentní také k cefuroximu, chloramfenikolu a tigecyklinu, což může představovat zvláštní riziko vzhledem k používání tigecyklinu jako rezervního antibiotika, nicméně je vhodné zmínit, že MIC spojená s rezistencí k tigecyklinu se pohybovala na hranici hodnoty odlišujících rezistentní a citlivé kmeny. Všechny tři izoláty nicméně zůstaly citlivé ke karbapenemům. Izolát KOL96 byl sice citlivý k cefoperazonu, nicméně izolát pocházející od stejného pacienta z jiného klinického materiálu (výtěr z rektu) již vykazoval rezistenci k tomuto antibiotiku. To může být způsobeno hustě osídleným prostředím střeva, ve kterém dochází k častému horizontálnímu genovému transferu, a střevo tak představuje ideální prostředí pro získ nových genů rezistence, což může být navíc umocněno teplotou 37 °C, při níž *E. coli* vykazuje vyšší schopnost transformace, ačkoliv dříve nebyla považována za druh přirozeně kompetentní (D. Sun et al. 2006; Zeng a Lin 2017). Vzhledem k tomu, že prostředí plic je obecně považováno za sterilní, může jít o vysvětlení, proč izolát získaný bronchoalveolární laváží byl k cefoperazonu citlivý.

Jiné studie zkoumající rezistentní fenotyp u izolátů nesoucích gen *mcr-1* ukázaly častou rezistenci k betalaktamům, ciprofloxacinu i tetracyklinu, naopak ke karbapenemům (ertapenemu, a zejména pak imipenemu a meropenemu) si bakterie nesoucí gen *mcr-1* převážně zachovávají citlivost, což je v souladu se závěry tohoto projektu. Častěji byla v jiných studiích pozorována rezistence ke kotrimoxazolu (Teo, Chew a Lin 2016; Bourrel et al. 2019; Zhong et al. 2018).

Častý výskyt rezistence k tetracyklinu u izolátů nesoucích gen *mcr-1* může naznačovat jejich zvířecí původ. Tetracyklinová rezistence je často nalézána u bakterií

izolovaných ze zvířat, jako tomu bylo například v jihokorejské studii, která detekovala rezistenci k tetracyklinu u 94,2 % (146/155) *E. coli* izolovaných ze stolice hovězího dobytka (Shin et al. 2015). K podobným závěrům dospěla i studie zkoumající tetracyklinovou rezistenci ve stolici drůbeže, která zaznamenala prevalenci 73 % (73/100) isolátů *E. coli* v Íránu (Seifi a Khoshbakht 2016). Srovnávací studie klinických isolátů a isolátů izolovaných ze stolice drůbeže pak byla provedena na Jamajce, kde autoři zaznamenali výrazně vyšší prevalenci tetracyklinové rezistence u zvířecích vzorků (82,4 %, 28/34) v porovnání s klinickými izoláty (43,8 %, 21/48) (Miles, McLaughlin a Brown 2006). Vysoká míra tetracyklinové rezistence souvisí s využíváním tetracyklinu v hospodářství pro jeho širokospektrý účinek a nízkou cenu (Seifi a Khoshbakht 2016).

Prevalence genu *mcr-1* u isolátů rezistentních ke kolistinu získaných v této studii dosahovala hodnoty 5,2 %, tedy mírně vyšší než u isolátů vykazujících kolistinovou rezistenci zachycených během studie střevního nosičství (3,1 %). Hodnota však může být zkreslená vzhledem k výrazně nižšímu počtu testovaných vzorků oproti studii bezpříznakového nosičství. Výrazně vyšší prevalence nosičství genu *mcr-1* byla zaznamenána mezi enterobakteriemi rezistentními ke kolistinu izolovanými od cestovatelů (13,3 %), což naznačuje, že cestovatelé jsou rizikovou skupinou pro přenos kolistinové rezistence mediované geny *mcr*. Relativně nízký záchyt genů *mcr* u klinických isolátů rezistentních ke kolistinu naznačuje, že mobilní rezistence nebude hlavní příčinou kolistinové rezistence v humánní sféře, která bude spočívat spíše v chromozomálních mutacích. Kolistinová rezistence (ať už mediovaná geny *mcr* či chromozomálními mutacemi) se však může brzy stát vážným rizikem. To může demonstrovat epidemie *K. pneumoniae* rezistentní ke karbapenémům (produkující enzym KPC), která zasáhla několik nemocnic v Litvě. Celkově bylo detekováno 200 případů. Varující je, že polovina isolátů, u nichž byla testována citlivost ke kolistinu (26/52 isolátů), vykazovala rezistenci k tomuto antibiotiku (ECDC: Stockholm 2019). Nedávno se také objevily popisy plazmidově vázaných genů (*tetX1-6*) způsobujících rezistenci k tigecyklinu (Leski et al. 2013; D. Liu et al. 2020; J. Sun et al. 2019; L. Wang et al. 2019; Nicoloff a Andersson 2016; He et al. 2019), který vedle karbapenémů a kolistinu představuje další rezervní antibiotikum pro léčbu multirezistentních enterobakterií. V případě rezistence ke všem zmíněným antibiotikům pak neexistuje alternativní léčba.

Další švýcarská studie byla provedena autory Liassine et al., kteří analyzovali výskyt genu *mcr-1* a *mcr-2* u 2049 klinických isolátů enterobakterií izolovaných z moči v období od února do března roku 2016 ve Švýcarsku. Autoři získali šest isolátů rezistentních ke kolistinu (prevalence 0,29 %, z toho dva kmeny bakterie *E. coli*, dva

*K. pneumoniae*, jeden *Hafnia alvei* a jeden *Salmonella* sp.), přičemž ale u žádného z nich nebyl stejně jako v předchozí studii detekován gen *mcr*. Jelikož bylo později zjištěno, že *Hafnia* je přirozeně rezistentní ke kolistinu, lze navíc prevalenci snížit na hodnotu 0,24 %. Po analýze negativních vzorků byl nalezen jeden citlivý izolát *E. coli* nesoucí gen *mcr-1*, což dává ve srovnání s hodnotami získanými v této studii velmi nízkou prevalenci nosičství genu *mcr* 0,05 %. Výrazně nižší byla i prevalence rezistence ke kolistinu oproti diplomové práci. Možným vysvětlením je také nízký selekční tlak v důsledku nízkého užívání kolistinu pro léčbu komunitních infekcí v humánní medicíně, ačkoliv je kolistin ve Švýcarsku využíván pro léčbu infekcí ve veterinární medicíně. Z toho plyne, že v uvedených letech nedocházelo k přenosu genů *mcr* ze zvířecích kmenů na kmeny humánní, nicméně může docházet k jejich tichému přenosu, což indikuje nalezení jednoho pozitivního a zároveň citlivého izolátu (Jayol et al. 2017; Liassine et al. 2016).

Nízký záchyt genu *mcr-1* byl detekován také celosvětově u 21006 klinických izolátů *E. coli* a *K. pneumoniae* izolovaných v letech 2014 až 2015. V této studii nicméně proběhla studie bezpříznakového nosičství pro detekci genu *mcr-1* pomocí PCR pouze u rezistentních izolátů, což může vést ke zkresleným výsledkům. Celosvětová prevalence výskytu genu *mcr-1* v rámci všech izolátů činila <0,1 %, při zahrnutí pouze ke kolistinu rezistentních izolátů pak 4,9 %. Ve všech případech se jednalo o bakterii *E. coli* (Castanheira et al. 2016).

#### 6.4 Retrospektivní analýza

Pro zjištění prevalence nosičství genů *mcr* z dlouhodobého hlediska byla analyzována sbírka enterobakterií izolovaných v letech 2011 až 2019, které byly dříve testovány na produkci širokospektrých betalaktamáz a/nebo karbapenemáz, a jedná se tak o rizikovou skupinu výskytu genů *mcr*. Na přítomnost genů *mcr-1* až *mcr-8* bylo celkem testováno 500 izolátů, nicméně žádný z genů *mcr* nebyl pomocí PCR a Sangerova sekvenování potvrzen ani v jednom případě. Možným vysvětlením, proč nebyly detekovány geny *mcr-1* až *mcr-8*, je fakt, že častým nositelem genů *mcr* bývá *E. coli* (Bourrel et al. 2019; La et al. 2019). Retrospektivní sbírka analyzovaná v této diplomové práci však obsahovala převážně izoláty *Klebsiella* spp. (67,8 %) a *Enterobacter* spp. (25 %), rod *Escherichia* tvořil pouze 5 %. Izoláty nesoucí geny *mcr* navíc bývají často citlivé ke karbapenemům (Bourrel et al. 2019; La et al. 2019), testovaná sbírka však obsahovala 39 % izolátů rezistentních k alespoň jednomu karbapenemu (meropenem, imipenem, ertapenem). Mikrodiluční metoda pro stanovení citlivosti ke kolistinu byla provedena pouze u 17 izolátů suspektních v rámci analýzy kvantitativní PCR a jako rezistentní se jevil pouze jeden izolát s hodnotou MIC vyšší než 16 mg/l.

Čínská studie analyzující výskyt genu *mcr-1* u *E. coli* a *K. pneumoniae* produkujících karbapenemázy zjistila (stejně jako tato studie) nízkou prevalenci 0,08 %. Jednalo se pouze o jeden izolát *E. coli* z 1311 vyšetřených izolátů, který byl rezistentní ke všem testovaným antibiotikům kromě tigecyklinu (Y. Li et al. 2018). Nízká prevalence 0,9 % izolátů (4/423) produkujících karbapenemázy a zároveň nesoucích gen *mcr-1* byla detekována na Taiwanu. Ve všech čtyřech případech šlo o izolát *E. coli* (Chen et al. 2019).

Jako rizikovější se zdá být přítomnost genu *mcr-9*, který bývá přítomen zpravidla u izolátů ke kolistinu citlivých, tudíž jeho přítomnost nelze detekovat metodami pro testování citlivosti v rutinním mikrobiologickém provozu. Gen *mcr-9* může tak tiše cirkulovat mezi bakteriemi, jeho exprese ale může být indukována nízkými dávkami kolistinu a může vést ke zvýšení MIC kolistinu u izolátů nesoucích tento gen (Kieffer et al. 2019). V diplomové práci byla stanovena prevalence genu *mcr-9* u bakterií testovaných na produkci betalaktamáz a/nebo karbapenemáz na 2,8 % (14/500). Z toho 14,3 % izolátů (2/14) bylo rezistentních ke kolistinu (*E. aerogenes* a *E. cloacae*) a 35,7 % (5/14) izolátů bylo rezistentních alespoň k jednomu testovanému karbapenemu (imipenem, meropenem, ertapenem).

Podobnou studii provedli také autoři Wang et al., kteří analyzovali výskyt genu *mcr-9* mezi izoláty *K. pneumoniae* izolovanými z klinických materiálů mezi lety 2013 a 2014 v Evropě a pozitivní izoláty byly dále testovány na produkci karbapenemáz. Autoři zjistili, že prevalence nosičství genu *mcr-9* činí 1,6 % (28 z 1717 izolátů) a 82,1 % (23/28) těchto izolátů bylo rezistentních ke karbapenemům (Yanan Wang et al. 2019). Japonská studie zaměřená na výskyt genu *mcr-9* mezi klinickými izoláty *E. cloacae* produkujícími karbapenemázy ukázala prevalenci nosičství genu *mcr-9* v 9,4 % (3/32) izolátů, přičemž všechny izoláty nesoucí gen *mcr-9* byly citlivé ke kolistinu (Kananizadeh et al. 2020). Vyšší prevalence ve zmíněné japonské studii však může být způsobena menším množstvím testovaných vzorků, a navíc se ve všech případech jednalo o rod *Enterobacter* spp., který se z výsledků studie provedené v rámci diplomové práce zdá být nejčastějším nositelem genu *mcr-9*.

Ze zmíněných studií i z této diplomové práce plyne, že ačkoliv se zdá být prevalence nosičství genu *mcr-9* nízká, v porovnání s jinými geny *mcr* se jedná o nejčastější gen *mcr* u enterobakterií. Hlavním rizikem se zdá být relativně dlouhá perzistence genu *mcr-9* v bakteriální populaci, což může představovat riziko tichého přenosu kolistinové rezistence a potenciální riziko selhání léčby.

## 6.5 Fyziologické vlastnosti

### 6.5.1 Indukce kolistinové rezistence

Vybrané kmeny pozitivní na přítomnost genu *mcr-9* (převážně ke kolistinu citlivé) byly v rámci testování indukce kolistinové rezistence vystaveny nízkým dávkám kolistinu s následným provedením mikrodiluční metody pro stanovení hodnoty MIC. K navýšení MIC došlo u 33,3 % izolátů (4/12) a u 75 % z nich (3/4) tato hodnota překročila hranici (2 mg/l), kdy je kmen diagnostikován jako rezistentní (EUCAST 2019). Z celkového počtu 12 izolátů se tedy povedlo indukovat rezistenci u 25,0 % z nich (3 izoláty).

Testování inducibility kolistinové rezistence bylo komplikováno tím, že řada izolátů vykazovala tzv. Eaglův efekt, tedy paradoxní růst při vyšších koncentracích, než byla stanovená MIC daného kmene (Eagle 1948), prakticky se projevující diskontinuálním růstem v rámci jamek při provedení mikrodiluční metody. Přičemž kontaminace jiným druhem bakterie byla vyloučena vyočkováním z příslušné jamky a druhovou identifikací. Testování bylo opakováno s obdobným výsledkem. Teoretickou příčinou tohoto jevu může být aktivace některého z chromozomálních mechanismů rezistence v důsledku vystavení bakterií vyšším dávkám antibiotika pouze u části bakteriální populace. Schurek et al. popsal u *Pseudomonas aeruginosa* při testování citlivosti vůči kolistinu a polymyxinu B, že vystavení bakterií vykazující zmíněný fenotyp nižším dávkám antibiotika v rámci preinkubace neindukuje vznik rezistence a přeskakujícího fenotypu s takovou pravděpodobností, jako je tomu u preinkubace s dávkami vyššími. Dle studie se zdá, že bakterie vykazující zmíněný fenotyp mají zvýšenou schopnost vnímat koncentraci polymyxinů v okolí a adekvátně na ni reagovat změnami exprese dvousložkových systémů PmrA/PmrB a PhoP/PhoQ (Schurek et al. 2009).

V rámci diplomové práce však bylo pracováno zejména s rodem *Enterobacter* spp., u kterého byla taktéž pozorována heterorezistence vyznačující se rezistencí ke kolistinu pouze u frakce testované populace bakterií po inkubaci za přítomnosti subinhibičních dávek kolistinu (Telke et al. 2017; Band et al. 2016). To může být rovněž možným vysvětlením pro pozorovaný fenotyp. Podobný problém s interpretací výsledků měli i autoři Landman et al., kteří pozorovali ve 33 % případů přeskokování jamek při testování citlivosti izolátů *E. cloacae* pomocí mikrodiluční metody. Autoři této studie pozorovali, že některé kmeny jeví se pomocí mikrodiluční metody jako rezistentní k polymyxinu B vykazují při testování pomocí E-testu MIC odpovídající citlivosti. To může být ale také způsobeno nepredikovatelnou prostupností polymyxinů agarem, která činí z E-testu suboptimální metodu pro testování citlivosti k těmto antibiotikům



(Matuschek et al. 2017; Landman, Salamera a Quale 2013). V náhodně vybraných kmenech byla testována heterorezistence analýzou populačního profilu, která byla potvrzena ve všech případech, vyšší zastoupení heterorezistence pak bylo u kmenů se zmíněným fenotypem přeskakujícím jamky. Autoři provedli popsání experimenty také s kmenem *E. aerogenes* a bylo dosaženo podobných výsledků (Landman, Salamera a Quale 2013).

Při kontrolní analýze testování inducibility u izolátů negativních na přítomnost genu *mcr-9* byl však pozorován podobný fenomén. Celkem u 66,7 % izolátů (6/9) došlo po expozici kolistinu k navýšení MIC a z celkového počtu 9 izolátů došlo k indukci rezistence u 44,4 % z nich (4 izoláty). Zda je příčinou indukované kolistinové rezistence gen *mcr-9* se tedy nepodařilo vyvrátit ani potvrdit a pro objasnění tohoto fenoménu budou nezbytné další analýzy mimo rozsah této diplomové práce. S určitostí však lze říct, že k indukci kolistinové rezistence existují kromě indukce exprese genu *mcr-9* i jiné alternativní mechanismy. Rezistentní fenotyp u kontrolních kmenů lze například vysvětlit heterorezistencí popsanou výše (Telke et al. 2017; Band et al. 2016).

Kmeny, u kterých se podařilo indukovat rezistenci, spadaly mezi rody *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. a *Klebsiella* spp. U rodů *Enterobacter* spp. a *Klebsiella* spp. byla pozorována indukce způsobená expozicí polymyxinovým antibiotikům i v rámci jiných studií, v žádném případě se však nejednalo o indukci genu *mcr-9*. U rodu *Klebsiella* spp. byla pozorována globální transkripční odpověď zahrnující například regulátor porinů OmpR nebo gen *arcB*, který jako senzorová kináza dvousložkového systému s pleiotrofním efektem mj. reguluje enzymy modifikace lipopolysacharidu. Zvýšená exprese byla pozorována i u sigma faktorů, které se podílí v rámci odpovědi na stres (Ramos et al. 2016).

Z uvedených závěrů vyplývá, že indukce kolistinové rezistence je po vystavení subletálními dávkami kolistinu možná, nicméně buď není vázaná na gen *mcr-9*, nebo existuje ještě jiný mechanismus zajišťující po expozici suboptimální dávce kolistinu rezistenci. Z dosud zveřejněných publikací je patrné, že indukce kolistinové rezistence je převážně vázaná na rod *Enterobacter* spp., a to buď prostřednictvím indukce genu *mcr-9* (Kieffer et al. 2019), indukci efluxních pump (zvýšenou expresí genů *acrA*, *acrB* a *tolC*) (Telke et al. 2017), a možná je pak i indukce nově objeveného genu *mcr-10* (C. Wang et al. 2020), či dalším dosud neznámým mechanismem.

Ze závěrů zmíněných studií i z výsledků diplomové práce se jeví polymyxinová antibiotika jako riziková k léčbě infekcí způsobených rodem *Enterobacter* spp., jelikož mohou indukovat rezistenci k těmto antibiotikům. Pro testování citlivosti se pak pro rod *Enterobacter* spp. jeví jako nevhodná metoda nejen diskový difuzní a E-test, ale i metoda

mikrodiluční, která může poskytovat neinterpretovatelné výsledky. Možností se zdá být vícenásobné testování citlivosti mikrodiluční metodou pro spolehlivější stanovení hodnoty MIC a testování heterorezistence, nicméně ani to nezaručí spolehlivé výsledky (Landman, Salamera a Quale 2013).

#### 6.5.2 Stanovení růstové rychlosti

S cílem porozumět podmínkám, které favorizují šíření izolátů vykazujících kolistinovou rezistenci, byl proveden pokus analyzující růstovou rychlost vybraných kmenů v prostředí s a bez přítomnosti subinhibičních dávek kolistinu. Zatímco referenční kmeny vykazovaly zvýšenou dobu zdvojení po přidání subinhibičních dávek kolistinu, u klinických kmenů byly výsledky méně předvídatelné. Z toho lze usuzovat, že experimenty prováděné na referenčních kmenech nelze vždy vztáhnout na klinické izoláty, jelikož se mohou chovat odlišně.

Obecně lze ze závěrů experimentu pro stanovení růstové rychlosti usoudit, že růst byl nejrychlejší v prostředí bez přidavku kolistinu, tedy doba zdvojení kmenů byla nejkratší. Výjimku tvořily pouze kmeny KOL63 (nesoucí *mcr-1* na plazmidu IncX4) a S340A (nesoucí *mcr-1* na chromozomu). Dále je patrné, že u všech kmenů došlo ke zpomalení růstu vlivem přidání 0,01 mg/l kolistinu. Po přidání vyšší dávky kolistinu (0,1 mg/l) jsou však již výsledky méně predikovatelné. Kmeny KOL53 (citlivý ke kolistinu) a KOL81 (rezistentní, nesoucí chromozomální mutaci) vykazovaly menší zpomalení při přidání vyšší koncentrace kolistinu v porovnání s přidáním 0,01 mg/l a kmeny KOL63 a S340A rostly dokonce rychleji při přidání vyšší dávky kolistinu než v prostředí bez antibiotika.

Izolát KOL63 vykazoval překvapivě nejrychlejší růst za přítomnosti 0,1 mg/l kolistinu. Příčinou může být přítomnost plazmidu IncX4 nesoucího gen *mcr-1*, který může hostiteli přinášet vyšší fitness (Wu et al. 2018). Je pravděpodobné, že přítomnost plazmidu v kombinaci s přidáním antibiotika mohla přinést hostiteli výhodu, nicméně zatím nebyl popsán mechanismus, kterým k navýšení fitness dochází. Plazmid IncX4 je však relativně malý (cca 33 až 34 kb) a často nenese žádné jiné geny rezistence kromě genu *mcr-1*, tudíž i z tohoto důvodu nepředstavuje pro jeho nositele zátěž (Hayashi et al. 2019). U kmene S340A nebyla pozorována signifikantní změna v růstové rychlosti po přidání antibiotika, což poukazuje na fakt, že gen *mcr-1* na chromozomu není pro bakterii replikační zátěží, jako tomu může být u plazmidově vázaných genů.

Referenční kmen KOL50 nesoucí gen *mcr-1* na zmíněném plazmidu IncHI2 (Doumith et al. 2016) pak rostl signifikantně rychleji než izolát KOL63 s plazmidem IncX4. Tento jev byl nicméně pozorován pouze v prostředí bez přidavku antibiotika, za přítomnosti vyšší dávky antibiotika byl pozorován opačný jev a kmen s genem *mcr-1*

na plazmidu IncHI2 naopak rostl pomaleji. Vliv na dobu zdvojení byl navíc pozorován tím víc, čím vyšší koncentrace antibiotika byla přítomna v médiu. To evokuje negativní vliv přítomného plazmidu IncHI2 na fitness za přítomnosti kolistinu, což koreluje i s jinými studiemi, ve kterých byla pozorována snížená fitness u *E. coli* s vpraveným plazmidem IncHI2 v porovnání s kmenem bez plazmidu (Ma, Feng a Zong 2018; Wu et al. 2018). Důvodem snížené fitness může být zátěž pro replikační aparát a zátěž v podobě exprese plazmidově kódovaných genů, jejichž produkty můžou následně interagovat s jinými hostitelskými proteiny, působit na buňku cytotoxicky či vést ke stresové odpovědi (Millan a MacLean 2017). Exprese je pak pravděpodobně úměrná koncentraci kolistinu v prostředí, tudíž při expozici vyšším dávkám kolistinu je pozorován větší vliv na růstovou rychlost. Zátěž je navíc umocněna faktem, že plazmid IncHI2 je relativně velký (265 538 bp). V uvedené studii však bylo také pozorováno, že po dvoutýdenním pasážování buněk došlo k částečnému navrácení původní fitness (Ma, Feng a Zong 2018). To může být dáno kompenzačními mutacemi v globálních regulátorech (dvousložkových systémech), což pravděpodobně sníží celkovou translaci v buňce a expresi plazmidových genů (Harrison et al. 2015) či kompenzačními mutacemi v proteinech účastnících se replikace plazmidů (Sota et al. 2010).

Kmen KOL81 nesoucí chromozomální mutaci dvousložkového systému PmrA/PmrB rostl při expozici kolistinu sice pomaleji, nicméně vyšší dávka antibiotika měla menší vliv na růst. Chromozomální mutace s sebou pravděpodobně nenese vliv na fitness, jelikož nebyl pozorován pomalejší růst při srovnání s jinými kmeny. To koresponduje i se studiemi provedenými u bakterie *Acinetobacter baumannii*, ve kterých byla při mutaci ve dvousložkovém systému PmrA/PmrB pozorována buď žádná, nebo jen mírná změna fitness (Gerson et al. 2019; Mu et al. 2016). Kmen citlivý ke kolistinu a nesoucí inaktivovaný gen *mcr-1* (P1301A) taktéž nevykazoval výrazný rozdíl v růstu v prostředí bez a s kolistinem. To může být vysvětleno tak, že gen *mcr-1* není exprimován, a tudíž nepředstavuje pro bakterii zátěž.

Závěrem lze říct, že přítomnost genu *mcr-1* může favorizovat kmen při růstu v prostředí s kolistinem (případ zejména kmene KOL63, ale také S340A). Tomu odpovídá i to, že se podobné zlepšení růstu po přidání kolistinu neprojevovalo u kmene s inaktivovaným genem *mcr-1* (P1301A). Vzhledem k výsledkům u kmene KOL50 však nejspíš záleží také na dalších genetických faktorech, než je jen přítomnost *mcr-1*. Vzhledem k rozdílným výsledkům klinických izolátů v porovnání s referenčními kmeny nelze vždy spoléhat na výsledky experimentů prováděných na referenčních kmenech, jelikož ty se mohou chovat odlišně.

### 6.5.3 Stanovení schopnosti kompetice

Pro stanovení schopnosti kompetice byly vybrány referenční kmeny KOL53 (citlivý ke kolistinu) a KOL50 (rezistentní ke kolistinu nesoucí gen *mcr-I* na plazmidu typu IncHI2) (Doumith et al. 2016), které byly společně kultivovány v prostředí bez kolistinu i v prostředí obsahujícím subletální dávky kolistinu (0,1 mg/l). V obou případech převládl rezistentní kmen, který zcela přerostl kmen citlivý.

Dle výsledků získaných v předchozím experimentu pro stanovení růstové rychlosti je patrné, že v prostředí bez kolistinu je doba zdvojení rezistentního kmene kratší o 2 minuty a 3 sekundy. Lze uvažovat o vyšší růstové rychlosti jako příčině převahy rezistentního kmene. Po dobu šesti dnů během experimentu byl pozorován relativně vyrovnaný poměr obou testovaných kmenů, lehce kolísající ve prospěch citlivého kmene, nicméně po 12 dnech již byl zaznamenán výrazný podíl rezistentního kmene, který nakonec zcela převládl. Vysvětlení ostrého přechodu mezi šestým a dvanáctým dnem může spočívat ve vzniku kompenzačních mutací, které vyrovnávají zátěž, kterou způsobuje plazmid IncHI2. Podle jiné studie totiž plazmid IncHI2 sice vede k mírnému snížení fitness, nicméně po 14 dnech dochází k jejímu částečnému navrácení na původní hodnotu, což je způsobeno pravděpodobně vlivem kompenzačních mutací (Ma, Feng a Zong 2018). Stejným způsobem si lze vysvětlit, proč došlo k plynulému nárůstu rezistentního kmene (který nakonec zcela převládl) také za přítomnosti antibiotika, ačkoliv v přítomnosti kolistinu o koncentraci 0,1 mg/l vykazovaly oba kmeny totožné časy zdvojení.

## 7 Závěr

Antibiotická rezistence je významným globálním problémem, který znesnadňuje efektivní léčbu a zvyšuje celosvětovou úmrtnost. Rezistence vzniká zejména v důsledku selekčního tlaku, který je na bakteriální populaci vyvíjen z důvodu užívání antibiotik v humánní i veterinární sféře. Vlivem preference antibiotik s menším spektrem nežádoucích účinků je spotřeba kolistinu v humánní medicíně nízká. V důsledku stoupající rezistence k jiným antibiotikům se však kolistin v posledních letech začal opět využívat, a to zejména u infekcí, u kterých neexistuje alternativní léčba (Fischer a Bild 2019; SÚKL 2015).

Celkový záchyt izolátů nesoucích geny *mcr* byl v rámci vypracování projektu dle očekávání nízký, což může být mimo jiné vysvětleno hypotézou zvířecího rezervoáru těchto genů, respektive chyběním takového rezervoáru v České republice. Autoři čínské studie, kteří jako první popsali plazmidově vázanou rezistenci ke kolistinu, uvádí, že nadměrné používání kolistinu v zemědělství může vést k selekci rezistentních bakterií u zvířat a může i následně podpořit jejich šíření nejen mezi zvířaty, ale i v lidské populaci (Liu et al. 2016). Dlouhodobá spotřeba kolistinu ve veterinární medicíně České republiky je však relativně nízká (ÚSKVBL 2019), což může být důvodem nízkého zachytu rezistentních izolátů v této studii. Signifikantní pokles prevalence enterobakterií nesoucích geny *mcr* (a kolonizujících hospodářská zvířata) následující po zákazu užívání kolistinu jako růstového hormonu v Číně dokazuje, že kontrola spotřeby může významně omezit šíření kolistinové rezistence (Yang Wang et al. 2020; C. Shen et al. 2020). Jiné hypotézy naopak předpokládají, že vlivem vysokých hygienických nároků při zpracování masa je nepravděpodobný přenos rezistentních bakterií ze zvířat na lidi. Za hlavní selekční tlak vedoucí k bakteriální rezistenci je tak považováno užívání antibiotik v humánní medicíně, zejména u hospitalizovaných pacientů. V nemocnicích bývá vysoká koncentrace nemocných lidí (často léčených imunosupresivy) na malém prostoru, což umožňuje efektivní šíření multirezistentních infekcí, které může být podpořeno špatnými hygienickými návyky zdravotnického personálu (Fischer a Bild 2019).

V předkládaném projektu bylo celkem detekováno osm neduplicitních izolátů pozitivních na přítomnost genu *mcr-I* za období let 2018 až 2019. Nejvíce z nich bylo detekováno v rámci studie bezpříznakového střevního nosičství u hospitalizovaných pacientů (pět izolátů), dva u cestovatelů, tři mezi klinickými rezistentními izoláty a žádný izolát pozitivní na přítomnost genu *mcr* nebyl nalezen v rámci retrospektivní sbírky izolátů enterobakterií testovaných na produkci širokospektrých betalaktamáz a/nebo karbapenemáz. Výsledky ukazují, že plazmidově vázaná kolistinová rezistence je vzhledem ke chromozomálně vázané kolistinové rezistenci stále minoritní a v současnosti

nepředstavuje v České republice vážnější zdravotní riziko. Problémem ovšem může být tichý přenos mezi citlivými kmeny zejména prostřednictvím genu *mcr-9* (případně prostřednictvím genu *mcr-10*), na což ukazuje i 14 detekovaných izolátů pozitivních na přítomnost genu *mcr-9* v této studii. Ačkoliv bylo celkově nalezeno relativně málo izolátů nesoucích geny *mcr*, je třeba zdůraznit, že i přes nízkou spotřebu kolistinu ve veterinární medicíně a zemědělství je situace u zvířecích izolátů značně méně příznivá (prevalence 70,6 % u krůtího masa lokálního i importovaného do České republiky), a není vyloučeno, že se zvířata mohou stát potenciálním zdrojem šíření genů *mcr* (Gelbicova et al. 2019).

V rámci experimentů testujících růstovou rychlost a kompetiční zdatnost bylo prokázáno, že vliv subinhibičních dávek kolistinu se může projevit na růstové rychlosti. Z hlediska růstové rychlosti pak na tom byl jednoznačně nejlépe kmen, který nesl gen *mcr-1* na chromozomu, a vykazoval při všech koncentracích antibiotika vysokou růstovou rychlost. Z výsledků kompetiční zdatnosti dále vyplývá, že i při srovnatelných dobách zdvojení rezistentního kmene nesoucího plazmid s genem *mcr-1* a kmene bez tohoto plazmidu, nakonec převládne rezistentní kmen, a to i v prostředí bez kolistinu. Z toho lze usuzovat, že některé z plazmidů nesoucí gen *mcr* mohou přinášet kompetiční výhodu svému nositeli i v prostředí bez antibiotika, a napomáhat tak šíření rezistence ke kolistinu. V neposlední řadě je třeba zmínit výsledky testu indukce rezistence, ze kterého vyplynulo, že kolistin je rizikový při léčbě infekcí způsobených rodem *Enterobacter* spp. Nízké dávky tohoto antibiotika totiž mohou způsobovat rezistenci ke kolistinu i u původně citlivých izolátů. Tento druh rezistence je ale nedetekovatelný standardním postupem testování antibiotické citlivosti v klinické praxi.

Šíření gramnegativních bakterií rezistentních ke karbapenemům je spolu s objevem genů *mcr*, které dále omezují možnosti léčby infekcí způsobených těmito patogeny, globální výzvou pro zdravotnické systémy. Zavedení rutinního testování citlivosti ke kolistinu pomocí vhodné metody (zejména pak mikrodiluční metodou) a využití PCR pro přímou detekci rezistentních genů je zásadní z toho důvodu, aby mohlo docházet k včasné identifikaci a léčbě infekcí spojených s enterobakteriemi nesoucími geny rezistence ke kolistinu a identifikaci přenašečů bakterií s touto rezistencí. Rutinní testování kolistinové rezistence by mělo zahrnovat zejména multirezistentní gramnegativní bakterie, izoláty od pacientů léčených kolistinem a izoláty od pacientů, kteří byli v nedávné době léčeni či hospitalizováni v zahraniční nemocnici (hlavně v zemích s vysokou prevalencí genů *mcr*). Pokud k testování citlivosti v těchto případech nebude docházet, nemůže být nastavena optimální léčba a preventivní opatření a rezistence ke kolistinu se může šířit populací a vést ke vzniku multirezistentních infekcí, pro které nemusí být dostupná účinná antibiotická léčba.

## 8 Souhrn

- Prevalence nosičství enterobakterií rezistentních ke kolistinu u hospitalizovaných pacientů bez příznaků střevní infekce činila 6,7 % vzorků. Prevalence nosičství enterobakterií nesoucích gen *mcr-1* však tvořila pouze 0,26 % všech vzorků, tudíž dle očekávání je zastoupení nízké. Větší zastoupení je pravděpodobně tvořeno izoláty nesoucími chromozomální mutace způsobující rezistenci ke kolistinu.
- Prevalence rezistence ke kolistinu byla u cestovatelů překvapivě jen mírně vyšší. Zastoupení enterobakterií rezistentních ke kolistinu mezi cestovateli činilo 7,9 % vzorků, podíl izolátů nesoucích gen *mcr-1* pak činil 1,1 % ze všech vzorků, což je opět jen mírně vyšší prevalence než detekovaná u hospitalizovaných pacientů.
- Zastoupení plazmidově vázané rezistence ke kolistinu mezi klinickými izoláty s prokázanou rezistencí ke kolistinu, které byly izolované z klinických materiálů, bylo 5,2 %, tedy dle očekávání bylo nízké. Větší část kolistinové rezistence měla jinou příčinu, pravděpodobně byla důvodem chromozomální mutace.
- Ve všech případech patřily izoláty nesoucí gen *mcr-1* k druhu *Escherichia coli* s minimální inhibiční koncentrací kolistinu 4 až 8 mg/l.
- Ve sbírce enterobakterií testovaných na přítomnost betalaktamáz a/nebo karbapenemáz nebyl nalezen žádný izolát nesoucí gen *mcr-1* až *mcr-8*. Naopak byla nalezena relativně vysoká prevalence výskytu genu *mcr-9* mezi těmito izoláty, která činila 2,8 %. Většina izolátů nesoucích gen *mcr-9* je ke kolistinu citlivá, nicméně expozicí nízkým dávkám kolistinu lze tuto rezistenci indukovat. Indukovaná rezistence je pak nejčastěji vázaná na rod *Enterobacter* spp.
- Expozice subletálními dávkami kolistinu může v některých případech zrychlit bakteriální růst, ale toho bylo dosaženo pouze u izolátů nesoucích intaktní gen *mcr-1* (na plazmidu či v rámci chromozomu). Kmeny nesoucí gen *mcr-1* pak získávají kompetiční výhodu oproti kmenům bez tohoto genu a již po 13 dnech kultivace v médiu obohaceném o subletální dávky kolistinu i bez něj zcela převládají.

## 9 Seznam použité literatury

- Abdelraouf, K., K. H. Braggs, T. Yin, L. D. Truong, M. Hu, and V. H. Tam. 2012. “Characterization of Polymyxin B-Induced Nephrotoxicity: Implications for Dosing Regimen Design.” *Antimicrob Agents Chemother* 56 (9): 4625–29.
- AbuOun, M., E. J. Stubberfield, N. A. Duggett, M. Kirchner, L. Dormer, J. Nunez-Garcia, L. P. Randall, et al. 2017. “*Mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) Variant Genes Identified in *Moraxella* Species Isolated from Pigs in Great Britain from 2014 to 2015.” *J Antimicrob Chemother* 73 (10): 2904.
- Acuña, L. G., J. M. Barros, D. Peñaloza, P. I. Rodas, D. Paredes-Sabja, J. A. Fuentes, F. Gil, and I. L. Calderón. 2016. “A Feed-Forward Loop between SroC and MgrR Small RNAs Modulates the Expression of EptB and the Susceptibility to Polymyxin B in *Salmonella* Typhimurium.” *Microbiology* 162 (11): 1996–2004.
- \* Aghapour, Z., P. Gholizadeh, K. Ganbarov, A. Z. Bialvaei, S. S. Mahmood, A. Tanomand, M. Yousefi, M. Asgharzadeh, B. Yousefi, and H. S. Kafil. 2019. “Molecular Mechanisms Related to Colistin Resistance in Enterobacteriaceae.” *Infect Drug Resist* 12: 965–75.
- \* Andersson, D. I., and D. Hughes. 2014. “Microbiological Effects of Sublethal Levels of Antibiotics.” *Nature Publishing Group* 12 (7). Nature Publishing Group: 1–14.
- Antipov, D., N. Hartwick, M. Shen, M. Raiko, and P. A. Pevzner. 2016. “PlasmidSPAdes: Assembling Plasmids from Whole Genome Sequencing Data.” *Bioinformatics* 32 (22): 3380–87.
- Aquilini, E., S. Merino, Y. A. Knirel, M. Regué, and J. M. Tomás. 2014. “Functional Identification of *Proteus mirabilis* EptC Gene Encoding a Core Lipopolysaccharide Phosphoethanolamine Transferase.” *Int J Mol Sci* 15 (4): 6689–6702.
- Aranda, C. M. A., J. A. Swansont, W. P. Loomis, and S. I. Miller. 1992. “*Salmonella* Typhimurium Activates Virulence Gene Transcription within Acidified Macrophage Phagosomes.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (21): 10079–83.
- Bader, M. W., S. Sanowar, M. E. Daley, A. R. Schneider, U. Cho, W. Xu, R. E. Klevit, H. Le Moual, and S. I. Miller. 2005. “Recognition of Antimicrobial Peptides by a Bacterial Sensor Kinase.” *Cell* 122 (3): 461–72.
- Balaban, N. Q., J. Merrin, R. Chait, L. Kowalik, and S. Leibler. 2004. “Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch.” *Science* 305 (5690): 1622–26.
- Band, V. I., E. K. Crispell, B. A. Napier, C. M. Herrera, G. K. Tharp, K. Vavikolanu, J. Pohl, et al. 2016. “Antibiotic Failure Mediated by a Resistant Subpopulation in *Enterobacter cloacae*.” *Nat Microbiol* 1 (6): 1–9.
- Baquero, F., J.-L. Martínez, and R. Cantón. 2008. “Antibiotics and Antibiotic Resistance in Water Environments.” *Curr Opin Biotechnol* 19 (3): 260–65.
- Bergen, P. J., J. Li, C. R. Rayner, and R. L. Nation. 2006. “Colistin Methanesulfonate Is an Inactive Prodrug of Colistin against *Pseudomonas Aeruginosa*.” *Antimicrob Agents Chemother* 50 (6): 1953–58.
- Bernasconi, O. J., E. Kuenzli, J. Pires, R. Tinguely, A. Carattoli, C. Hatz, and V. Perreten. 2016. “Travelers Can Import Colistin-Resistant Enterobacteriaceae, Including Those Possessing the Plasmid-Mediated *Mcr-1* Gene.” *Antimicrob Agents Chemother* 60 (8): 5080–84.
- Borowiak, M., J. Fischer, J. A. Hammerl, R. S. Hendriksen, I. Szabo, and B. Malorny. 2017. “Identification of a Novel Transposon-Associated Phosphoethanolamine Transferase Gene, *Mcr-5*, Conferring Colistin Resistance in d-Tartrate Fermenting *Salmonella Enterica* Subsp. *Enterica* Serovar Paratyphi B.” *J Antimicrob Chemother* 72 (12): 3317–24.



- Boucher, H. W., G. H. Talbot, J. S. Bradley, J. E. Edwards, D. Gilbert, L. B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, and J. Bartlett. 2009. "Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America." *Clinical Infectious Diseases* 48 (1): 1–12.
- Bourrel, A. S., L. Poirel, G. Royer, X. Vuillemin, N. Kieffer, O. Clermont, E. Denamur, P. Nordmann, and J.-W. Decousser. 2019. "Colistin Resistance in Parisian Inpatient Faecal *Escherichia Coli* as the Result of Two Distinct Evolutionary Pathways." *J Antimicrob Chemother* 76 (6): 1521–30.
- Cannatelli, A., M. M. D'Andrea, T. Giani, V. Di Pilato, F. Arena, S. Ambretti, P. Gaibani, and G. M. Rossolini. 2013. "In Vivo Emergence of Colistin Resistance in *Klebsiella Pneumoniae* Producing KPC-Type Carbapenemases Mediated by Insertional Inactivation of the PhoQ/PhoP MgrB Regulator ." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (11): 5521–26.
- Cannatelli, A., V. Di Pilato, T. Giani, F. Arena, S. Ambretti, P. Gaibani, M. M. D'Andrea, and G. M. Rossolini. 2014. " In Vivo Evolution to Colistin Resistance by PmrB Sensor Kinase Mutation in KPC-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Is Associated with Low-Dosage Colistin Treatment ." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (8): 4399–4403.
- Carattoli, A., L. Villa, C. Feudi, L. Curcio, S. Orsini, A. Luppi, G. Pezzotti, and C. F. Magistrali. 2017. "Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance *Mcr-4* Gene in *Salmonella* and *Escherichia Coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016." *Euro Surveill* 22 (31): 1–5.
- Carroll, L. M., A. Gaballa, C. Guldemann, G. Sullivan, L. O. Henderson, and M. Wiedmann. 2019. "Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *Mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella Enterica* Serotype Typhimurium Isolate Laura." *MBio* 10 (3): 1–6.
- Castanheira, M., M. A Griffin, L. M. Deshpande, R. E. Mendes, R. N. Jones, and R. K. Flamm. 2016. "Detection of *Mcr-1* among *Escherichia Coli* Clinical Isolates Collected Worldwide as Part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in 2014 and 2015." *Antimicrob Agents Chemother* 60 (9): 5623–24.
- Center for Disease Dynamics; Economics & Policy. 2015. "State of the World's Antibiotics." *CDDEP: Washington DC*.
- Chamngongpol, S., W. Dodson, M. J. Cromie, Z. L. Harris, and E. A. Groisman. 2002. "Fe(III)-Mediated Cellular Toxicity." *Molecular Microbiology* 45 (3): 711–19.
- Chavda, K. D., L. F. Westblade, M. J. Satlin, A. C. Hemmert, M. Castanheira, S. G. Jenkins, L. Chen, and N. Kreiswirth. 2019. "First Report of BlaVIM-4- and *Mcr-9*-Coharboring *Enterobacter* Species Isolated from a Pediatric Patient." *MSphere* 4 (5): 1–6.
- Chen, C.-W., H.-J. Tang, C.-C. Chen, Y.-C. Lu, H.-J. Chen, B.-A. Su, T.-C. Weng, Y.-C. Chuang, and C.-C. Lai. 2019. "The Microbiological Characteristics of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Carrying the *Mcr-1* Gene." *J Clin Med* 8 (2): 1–11.
- Cheng, Y.-H., T.-L. Lin, Y.-T. Lin, and J.-T. Wang. 2016. "Amino Acid Substitutions of CrrB Responsible for Resistance to Colistin through CrrC in *Klebsiella Pneumoniae*." *Antimicrob Agents Chemother* 60 (6): 3709–16.
- Cheng, Y.-H., T.-L. Lin, Y.-T. Lin, and J.-T. Wang. 2018. "A Putative RND-Type Efflux Pump, H239\_3064, Contributes to Colistin Resistance through CrrB in *Klebsiella Pneumoniae*." *J Antimicrob Chemother* 73 (6): 1509–16.
- Couet, W., N. Grégoire, P. Gobin, P. J. Saulnier, D. Frasca, S. Marchand, and O. Mimoz. 2011. "Pharmacokinetics of Colistin and Colistimethate Sodium After a Single 80-Mg Intravenous Dose of CMS in Young Healthy Volunteers." *Clini Pharmacol Ther* 89 (6): 875–879.
- Creighton, J., T. Anderson, J. Howard, K. Dyet, X. Ren, and J. Freeman. 2019. "Co-Occurrence of *Mcr-1* and *Mcr-3* Genes in a Single *Escherichia Coli* in New Zealand." *J Antimicrob Chemother* 74 (10): 3113–16.

- Dai, C., J. Li, S. Tang, J. Li, and X. Xiao. 2014. "Colistin-Induced Nephrotoxicity in Mice Involves the Mitochondrial, Death Receptor, and Endoplasmic Reticulum Pathways." *Antimicrob Agents Chemother* 58 (7): 4075–85.
- Dalfino, L., F. Puntillo, A. Mosca, R. Monno, M. L. Spada, S. Coppolecchia, G. Miragliotta, F. Bruno, and N. Brienza. 2012. "High-Dose, Extended-Interval Colistin Administration in Critically Ill Patients: Is This the Right Dosing Strategy? A Preliminary Study." *Clin Infect Dis* 54 (12): 1720–26.
- Dalmolin, T. V., D. De Lima-Morales, and A. L. Barth. 2018. "Plasmid-Mediated Colistin Resistance: What Do We Know?" *Journal of Infectiology* 1 (2): 16–22.
- Dortet, L., R. A. Bonnin, I. Pennisi, L. Gauthier, A. B. Jousset, L. Dabos, R. C. D. Furniss, et al. 2018. "Rapid Detection and Discrimination of Chromosome- and MCR-Plasmid-Mediated Resistance to Polymyxins by MALDI-TOF MS in *Escherichia Coli*: The MALDIxin Test." *J Antimicrob Chemother* 73 (12): 3359–67.
- Doshi, N. M., D. Pharm, K. L. Mount, D. Pharm, C. V. Murphy, and D. Pharm. 2011. "Nephrotoxicity Associated with Intravenous Colistin in Critically Ill Patients." *Pharmacotherapy* 31 (12): 1257–64.
- Doumith, M., G. Godbole, P. Ashton, L. Larkin, T. Dallman, M. Day, M. Day, et al. 2016. "Detection of the Plasmid-Mediated *Mcr-1* Gene Conferring Colistin Resistance in Human and Food Isolates of *Salmonella Enterica* and *Escherichia Coli* in England and Wales." *J Antimicrob Chemother* 71 (8): 2300–2305.
- Eagle, H. 1948. "A Paradoxical Zone Phenomenon in the Bactericidal Action of Penicillin in Vitro." *Science* 107 (2767): 44–45.
- ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control. "Plasmid-mediated colistin resistance in Enterobacteriaceae, 15 June 2016." ECDC: Stockholm; 2016.
- ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control. "Outbreak of carbapenemase-producing Enterobacterales in Lithuania – 18 December 2019." ECDC: Stockholm; 2019.
- Eichhorn, I., C. Feudi, Y. Wang, H. Kaspar, A. T. Feßler, A. Lu, G. B. Michael, J. Shen, and S. Schwarz. 2018. "Identification of Novel Variants of the Colistin Resistance Gene *Mcr-3* in *Aeromonas* Spp. from the National Resistance Monitoring Programme GE RM -Vet and from Diagnostic Submissions." *J Antimicrob Chemother* 73 (5): 1217–21.
- Ellem, J. A., A. N. Ginn, S. C. Chen, J. Ferguson, S. R. Partridge, and J. R. Iredell. 2017. "Locally Acquired *Mcr-1* in *Escherichia coli*, Australia, 2011 and 2013." *Emerg Infect Dis* 23 (7): 1160–63.
- EMA 2016: European Medicines Agency. "Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health." EMA/231573/2016
- EMA 2020: European Medicines Agency. "European expert group proposes reduction of use in animals of last resort antibiotic colistin to manage risk of resistance 2016." <https://www.ema.europa.eu/en/news/european-expert-group-proposes-reduction-use-animals-last-resort-antibiotic-colistin-manage-risk>, July 2020.
- EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. "Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters." Version 6.0. EUCAST; 2016. Dostupné z: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_6.0\\_Breakpoint\\_table.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf).
- EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Data from the EUCAST MIC distribution website, last accessed 17th July 2020, <http://www.eucast.org>.
- Evans, M. E., D. J. Feola, and R. P. Rapp. 1999. "Polymyxin B Sulfate and Colistin: Old Antibiotics for

- Emerging Multiresistant Gram-Negative Bacteria.” *Ann Pharmacother* 33 (9): 960–67.
- Falgenhauer, L., S. E. Waezsada, Y. Yao, C. Imirzalioglu, A. Käsbohrer, U. Roesler, G. B. Michael, et al. 2016. “Colistin Resistance Gene *Mcr-1* in Extended- Spectrum  $\beta$ -Lactamase- Producing and Carbapenemase- Producing Gram-Negative Bacteria in Germany.” *Lancet Infect Dis* 16 (3): 282–83.
- Fischer, M. M., and M. Bild. 2019. “Hospital Use of Antibiotics as the Main Driver of Infections with Antibiotic-Resistant Bacteria – a Reanalysis of Recent Data from the European Union.” *BioRxiv*, 553537.
- Garonzik, S. M., J. Li, V. Thamlikitkul, D. L. Paterson, S. Shoham, J. Jacob, F. P. Silveira, A. Forrest, and R. L. Nation. 2011. “Population Pharmacokinetics of Colistin Methanesulfonate and Formed Colistin in Critically Ill Patients from a Multicenter Study Provide Dosing Suggestions for Various Categories of Patients.” *Antimicrob Agents Chemother* 55 (7): 3284–94.
- Gelbicova, T., I. Kolackova, M. Krutova, and R. Karpiskova. 2019. “The Emergence of *Mcr-1*-Mediated Colistin-Resistant *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae* in Domestic and Imported Turkey Meat in the Czech Republic 2017–2018.” *Folia Microbiol (Praha)* 65 (1): 211–216.
- Germ, J., T. C. Kišek, B. K. Ulčar, T. L. Zupanc, T. Mrvič, M. K. Povšič, K. Seme, and M. Pirs. 2019. “Surveillance Cultures for Detection of Rectal and Lower Respiratory Tract Carriage of Colistin-Resistant Gram-Negative Bacilli in Intensive Care Unit Patients: Comparison of Direct Plating and Pre-Enrichment Step.” *J Med Microbiol* 68 (9): 1269–78.
- Gerson, S., J. W. Betts, K. Lucaßen, C. S. Nodari, J. Wille, M. Josten, S. Göttig, et al. 2019. “Investigation of Novel PmrB and EptA Mutations in Isogenic *Acinetobacter Baumannii* Isolates Associated with Colistin Resistance and Increased Virulence In Vivo.” *Antimicrob Agents Chemother* 63 (3): 1–15.
- Ghlissi, Z., A. Hakim, H. Mnif, F. M. Ayadi, K. Zeghal, T. Rebai, and Z. Sahnoun. 2013. “Evaluation of Colistin Nephrotoxicity Administered at Different Doses in the Rat Model.” *Renal Failure* 35 (8): 1130–35.
- Giani, T., S. Sennati, A. Antonelli, V. Di Pilato, T. Maggio, A. Mantella, C. Nocolai, et al. 2018. “High Prevalence of Carriage of *Mcr-1*-Positive Enteric Bacteria among Healthy Children from Rural Communities in the Chaco Region, Bolivia, September to October 2016.” *Euro Surveill* 23 (45): 1–9.
- Groisman, E. A., J. Kayser, and F. C. Soncini. 1997. “Regulation of Polymyxin Resistance and Adaptation to Low-Mg<sup>2+</sup> Environments.” *Journal of Bacteriology* 179 (22): 7040–45.
- Guckes, K. R., M. Kostakioti, E. J. Breland, A. P. Gu, C. L. Shaffer, C. R. Martinez, S. J. Hultgren, and M. Hadjifrangiskou. 2013. “Strong Cross-System Interactions Drive the Activation of the QseB Response Regulator in the Absence of Its Cognate Sensor.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (41): 16592–97.
- Gunn, J. S., K. B. Lim, J. Krueger, K. Kim, L. Guo, M. Hackett, and S. I. Miller. 1998. “PmrA-PmrB-Regulated Genes Necessary for 4-Aminoarabinose Lipid A Modification and Polymyxin Resistance.” *Molecular Microbiology* 27 (6): 1171–82.
- Gunn, J. S., S. S. Ryan, J. C. van Velkinburgh, R. K. Ernst, and S. I. Miller. 2000. “Genetic and Functional Analysis of a PmrA-PmrB-Regulated Locus Necessary for Lipopolysaccharide Modification, Antimicrobial Peptide Resistance, and Oral Virulence of *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium.” *Infect Immun* 68 (11): 6139–46.
- Guo, Y. B., L. P. Chen, H. W. Cao, N. Wang, J. Zheng, and G. X. Xiao. 2007. “Polymyxin B Antagonizing Biological Activity of Lipopolysaccharide.” *Chin J Traumatol* 10 (3): 180–83.
- Hadjadj, L., T. Riziki, Y. Zhu, J. Li, S. M. Diene, and J.-M. Rolain. 2017. “Study of *Mcr-1* Gene-

- Mediated Colistin Resistance in Enterobacteriaceae Isolated from Humans and Animals in Different Countries.” *Genes (Basel)* 8 (12): 1–16.
- Haecili, M., A. Javani, J. Moradi, and Z. Jafari. 2017. “MgrB Alterations Mediate Colistin Resistance in *Klebsiella Pneumoniae* Isolates from Iran.” *Front Microbiol* 18; 8: 2470.
- Haenni, M., L. Poirel, N. Kieffer, P. Châtre, E. Saras, V. Métayer, R. Dumoulin, P. Nordmann, and J.-Y. Madec. 2016. “Co-Occurrence of Extended Spectrum  $\beta$  Lactamase and MCR-1 Encoding Genes on Plasmids.” *Lancet Infect Dis* 16 (3): 281–2.
- Halaby, T., E. Kucukkose, A.B. Janssen, M. R. C. Rogers, D. J. Doorduijn, A. G. M. Van Der Zanden, N. Naiemi, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, and W. van Schaik. 2016. “Genomic Characterization of Colistin Heteroresistance in *Klebsiella Pneumoniae* during a Nosocomial Outbreak.” *Antimicrob Agents Chemother* 60 (11): 6837–43.
- Hancock, R. E. 1997. “The Bacterial Outer Membrane as a Drug Barrier.” *Trends Microbiol* 5 (1): 37–42.
- Harrison, E., D. Guymer, J. Spiers, S. Paterson, and M. A. Brockhurst. 2015. “Parallel Compensatory Evolution Stabilizes Plasmids across the Parasitism-Mutualism Continuum.” *Curr Biol* 25 (15): 2034–39.
- Hasman, H., A. M. Hammerum, F. Hansen, R. S. Hendriksen, B. Olesen, Y. Agersø, E. Zankari, et al. 2015. “Detection of *Mcr-1* Encoding Plasmid-Mediated Colistin-Resistant *Escherichia Coli* Isolates from Human Bloodstream Infection and Imported Chicken Meat, Denmark 2015.” *Euro Surveill* 20 (49): 1–5.
- Hayashi, W., H. Tanaka, Y. Taniguchi, M. Iimura, E. Soga, R. Kubo, N. Matsuo, et al. 2019. “Acquisition of *Mcr-1* and Cocarriage of Virulence Genes in Avian Pathogenic *Escherichia Coli* Isolates from Municipal Wastewater Influent in Japan.” *Appl Environ Microbiol* 85 (22): 1–11.
- He, T., R. Wang, D. Liu, T. R. Walsh, R. Zhang, Y. Lv, Y. Ke, et al. 2019. “Emergence of Plasmid-Mediated High-Level Tigecycline Resistance Genes in Animals and Humans.” *Nat Microbiol* 4 (9): 1450–1456.
- Helander, I. M., Y. Kato, I. Kilpeläinen, R. Kostianen, B. Lindner, K. Nummila, T. Sugiyama, and T. Yokochi. 1996. “Characterization of Lipopolysaccharides of Polymyxin-Resistant and Polymyxin-Sensitive *Klebsiella Pneumoniae* O3.” *Eur J Biochem* 237 (1): 272–78.
- Jauregui, F., L. Landraud, V. Passet, L. Diancourt, E. Frapy, G. Guigon, E. Carbonnelle, et al. 2008. “Phylogenetic and Genomic Diversity of Human Bacteremic *Escherichia Coli* Strains.” *BMC Genomics* 9:560: 1–14.
- Jayol, A., P. Nordmann, A. Brink, M.-V. Villegas, V. Dubois, and L. Poirel. 2017. “High-Level Resistance to Colistin Mediated by Various Mutations in the *CrrB* Gene Among Carbapenemase-Producing *Klebsiella Pneumoniae*.” *Antimicrob Agents Chemother* 61 (11): 1–4.
- Jayol, A., M. Saly, P. Nordmann, A. Ménard, L. Poirel, and V. Dubois. 2017. “Hafnia, an Enterobacterial Genus Naturally Resistant to Colistin Revealed by Three Susceptibility Testing Methods.” *J Antimicrob Chemother* 72 (9): 2507–11.
- Johnson, L., S. R. Horsman, L. Charron-Mazenod, A. L. Turnbull, H. Mulcahy, M. G. Surette, and S. Lewenza. 2013. “Extracellular DNA-Induced Antimicrobial Peptide Resistance in *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium.” *BMC Microbiol* 13:115.
- Kananizadeh, P., S. Oshiro, S. Watanabe, S. Iwata, K. Kuwahara-Arai, M. Shimojima, M. Ogaqa, T. Tada, and T. Kirikae. 2020. “Emergence of Carbapenem-Resistant and Colistin-Susceptible *Enterobacter Cloacae* Complex Co-Harboring *Bla* IMP-1 and *Mcr-9* in Japan.” *BMC Infect Dis* 20 (1): 282.
- Keffer, N., P. Nordmann, and L. Poirel. 2017. “*Moraxella* Species as Potential Sources of MCR-Like

- Polymyxin Resistance Determinants” 61 (6): 1–7.
- Kempf, I., M. Alain, D. Drider, M. Bruneau, P. Sanders, C. Chauvin, J.-Y. Madec, and E. Jouy. 2013. “What Do We Know about Resistance to Colistin in Enterobacteriaceae in Avian and Pig Production in Europe?” *Int J Antimicrob Agents* 42 (5): 379–83.
- Kieffer, N., G. Royer, J. W. Decousser, A. S. Bourrel, M. Palmieri, J. M. Ortiz De La Rosa, H. Jacquier, E. Denamur, P. Nordmann, and L. Poirel. 2019. “*Mcr-9*, an Inducible Gene Encoding an Acquired Phosphoethanolamine Transferase in *Escherichia Coli*, and Its Origin.” *Antimicrob Agents Chemother* 63 (9): e00965-19.
- Koch-Weser, J., V. W. Sidel, E. B. Federman, P. Kanarek, D. C. Finer, and A. E. Eaton. 2013. “Adverse Effects of Sodium Colistimethate. Manifestations and Specific Reaction Rates during 317 Courses of Therapy.” *Ann Intern Med* 72 (6): 857–868.
- Kox, L. F. F., M. M. S. M. Wösten, and E. A. Groisman. 2000. “A Small Protein That Mediates the Activation of a Two-Component System by Another Two-Component System.” *EMBO J* 19 (8): 1861–72.
- Koyama, Y., A. Kurosawa, A. Tsuchiya, and K. Takakuta. 1950. “New Antibiotic ‘colistin’ Produced by Spore-Forming Soil Bacteria.” *J Antibiot* 3: 457–58.
- Kubikowski, P., and Z. Szreniawski. 1963. “The Mechanism of the Neuromuscular Blockade by Antibiotics.” *Arch Int Pharmacodyn Ther* 146: 549–60.
- Kumarasamy, K. K., M. A. Toleman, T. R. Walsh, J. Bagaria, F. Butt, R. Balakrishnan, U. Chaudhary, et al. 2010. “Emergence of a New Antibiotic Resistance Mechanism in India, Pakistan, and the UK: A Molecular, Biological, and Epidemiological Study.” *Lancet Infect Dis* 10 (9): 597–602.
- La, M.-V., B. Lee, B. Z. M. Hong, J. Y. Yah, S.-H. Koo, B. Jiang, L. S. Y. Ng, and T.-Y. Tan. 2019. “Prevalence and Antibiotic Susceptibility of Colistin-Resistance Gene (*Mcr-I*) Positive Enterobacteriaceae in Stool Specimens of Patients Attending a Tertiary Care Hospital in Singapore.” *Int J Infect Dis* 85: 124–26.
- Landman, D., J. Salamera, and J. Quale. 2013. “Irreproducible and Uninterpretable Polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*.” *J Clin Microbiol* 51 (12): 4106–11.
- Leclercq, R., R. Cantón, D. F. Brown, C. G. Giske, P. Heisig, A. P. MacGowan, J. W. Mouton, et al. 2013. “EUCAST Expert Rules in Antimicrobial Susceptibility Testing.” *Clin Microbiol Infect* 19 (2): 141–60.
- Lee, H., F.-F. Hsu, J. Turk, and E. A. Groisman. 2004. “The PmrA-Regulated PmrC Gene Mediates Phosphoethanolamine Modification of Lipid A and Polymyxin Resistance in *Salmonella Enterica*.” *J Bacteriol* 186 (13): 4124–33.
- Leski, T. A., U. Bangura, D. Henry, R. Ansumana, S. E. Lizewski, D. A. Stenger, C. Rowe, and G. J. Vora. 2013. “Multidrug-Resistant Tet(X)-Containing Hospital Isolates in Sierra Leone.” *Int J Antimicrob Agents* 42 (1): 83–86.
- Li, J., R. L. Nation, R. W. Milne, J. D. Turnidge, and K. Coulthard. 2005. “Evaluation of Colistin as an Agent against Multi-Resistant Gram-Negative Bacteria.” *Int J Antimicrob Agents* 25 (1): 11–25.
- Li, R., M. Xie, J. Zhang, Z. Yang, L. Liu, X. Liu, Z. Zheng, E. W.-C. Chan, and S. Chen. 2017. “Genetic Characterization of *Mcr-I*-Bearing Plasmids to Depict Molecular Mechanisms Underlying Dissemination of the Colistin Resistance Determinant.” *J Antimicrob Chemother* 72 (2): 393–401.
- Li, R., H. Yu, M. Xie, K. Chen, N. Dong, D. Lin, E. W.-C. Chan, and S. Chen. 2018. “Genetic Basis of Chromosomally-Encoded *Mcr-I* Gene.” *Int J Antimicrob Agents* 51 (4): 578–85.
- Li, Y., Q.-I. Sun, Y. Shen, Y. Zhang, J.-W. Yang, L.-B. Shu, H.-W. Zhou, et al. 2018. “Rapid Increase in

- Prevalence of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE) and Emergence of Colistin Resistance Gene *Mcr-I* in CRE in a Hospital in Henan, China.” *J Clin Microbiol* 56 (4): 1–6.
- Liassine, N., L. Assouvie, M.-C. Descombes, V. D. Tendon, N. Kieffer, L. Poirel, and P. Nordmann. 2016. “Very Low Prevalence of *MCR-1/MCR-2* Plasmid-Mediated Colistin Resistance in Urinary Tract Enterobacteriaceae in Switzerland.” *Int J Infect Dis* 51: 4–5.
- Liu, D., W. Zhai, H. Song, Y. Fu, S. Schwarz, T. He, L. Bai, Y. Wang, T. R. Walsh, and J. Shen. 2020. “Identification of the Novel Tigecycline Resistance Gene Tet(X6) and Its Variants in *Myroides*, *Acinetobacter* and *Proteus* of Food Animal Origin.” *J Antimicrob Chemother* 75: 1428–31.
- Liu, Y.-Y., Y. Wang, T. R. Walsh, L.-X. Yi, R. Zhang, J. Spencer, Y. Doi, et al. 2016. “Emergence of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Mechanism *MCR-1* in Animals and Human Beings in China: A Microbiological and Molecular Biological Study.” *Lancet Infect Dis* 16 (2): 161–68.
- Livermore, D. M. 2002. “Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa*: Our Worst Nightmare?” *Clin Infect Dis* 34 (5): 634–40.
- Lu, X., X. Xiao, Y. Liu, Y. Li, R. Li, and Z. Wang. 2019. “Chromosome-Mediated *Mcr-I* in *Escherichia Coli* Strain L73 from a Goose.” *Int J Antimicrob Agents* 54 (1): 99–101.
- Luo, Q., W. Yu, K. Zhou, L. Guo, P. Shen, H. Lu, C. Huang, et al. 2017. “Molecular Epidemiology and Colistin Resistant Mechanism of *Mcr*-Positive and *Mcr*-Negative Clinical Isolated *Escherichia Coli*.” *Front Microbiol* 8: 2262.
- Ma, K., Y. Feng, and Z. Zong. 2018. “Fitness Cost of a *Mcr-I*-Carrying IncHI2 Plasmid.” *PLoS One* 13 (12): 1–9.
- Mahalakshmi, S., M. R. Sunayana, L. SaiSree, and M. Reddy. 2014. “YciM Is an Essential Gene Required for Regulation of Lipopolysaccharide Synthesis in *Escherichia Coli*.” *Mol Microbiol* 91 (1): 145–57.
- Maier, L., M. Pruteanu, M. Kuhn, G. Zeller, A. Telzerow, E. E. Anderson, A. R. Brochado, et al. 2018. “Extensive Impact of Non-Antibiotic Drugs on Human Gut Bacteria.” *Nature* 555 (7698): 623–28.
- Matamoros, S., J. M. van Hattem, M. S. Arcilla, N. Willemse, C. D. Melles, J. Penders, T. N. Vinh, et al. 2017. “Global Phylogenetic Analysis of *Escherichia Coli* and Plasmids Carrying the *mcr-I* Gene Indicates Bacterial Diversity but Plasmid Restriction,” *Sci Rep* 7 (1): 15364.
- Matuschek, E., J. Åhman, C. Webster, and G. Kahlmeter. 2017. “Antimicrobial Susceptibility Testing of Colistin - Evaluation of Seven Commercial MIC Products against Standard Broth Microdilution for *Escherichia Coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Pseudomonas Aeruginosa*, and *Acinetobacter Spp.*” *Clin Microbiol Infect* 24 (8): 865–870.
- McQuillen, M. P., and L. Engbaek. 1975. “Mechanism of Colistin-Induced Neuromuscular Depression.” *Arch Neurol* 32 (4): 235–38.
- Miles, T. D., W. McLaughlin, and P. D. Brown. 2006. “Antimicrobial Resistance of *Escherichia Coli* Isolates from Broiler Chickens and Humans.” *BMC Vet Res* 2:7: 1–9.
- Millan, A. S., and R. C. MacLean. 2017. “Fitness Costs of Plasmids: A Limit to Plasmid Transmission.” *Microbiol Spectr* 5 (5): 1–12.
- Mohamed, A. F., I. Karaikos, D. Plachouras, M. Karvanen, K. Pontikis, B. Jansson, E. Papadomichelakis, et al. 2012. “Application of a Loading Dose of Colistin Methanesulfonate in Critically Ill Patients: Population Pharmacokinetics, Protein Binding, and Prediction of Bacterial Kill.” *Antimicrob Agents Chemother* 56 (8): 4241–49.
- Moon, K., and S. Gottesma. 2009. “A PhoQ/P-Regulated Small RNA Regulates Sensitivity of *Escherichia Coli* to Antimicrobial Peptides.” *Mol Microbiol* 74 (6): 1314–30.

- Mu, X., N. Wang, X. Li, K. Shi, Z. Zhou, Y. Yu, and X. Hua. 2016. "The Effect of Colistin Resistance-Associated Mutations on the Fitness of *Acinetobacter Baumannii*." *Front Microbiol* 7:1715: 1–8.
- Murray, S. R, R. K. Ernst, D. Bermudes, S. I. Miller, and K. B. Low. 2007. "PmrA(Con) Confers *PmrHFIJKL*-Dependent EGTA and Polymyxin Resistance on MsbB *Salmonella* by Decorating Lipid A with Phosphoethanolamine." *J Bacteriol* 189 (14): 5161–69.
- Nabti, L. Z., F. Sahli, E. P. Ngaiganam, N. Radji, W. Mezaghcha, D. Lupande-Mwenebitu, S. A. Baron, J.-M. Rolain, and S. M. Diene. 2019. "Development of Real-Time PCR Assay Allowed Describing the First Clinical *Klebsiella Pneumoniae* Isolate Harboring Plasmid-Mediated Colistin Resistance *Mcr-8* Gene in Algeria." *J Glob Antimicrob Resist* 20: 266–71.
- Nakayama, T., Y. Kumeda, R. Kawahara, T. Yamaguchi, and Y. Yamamoto. 2018. "Carriage of Colistin-Resistant, Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia Coli* Harboring the *Mcr-1* Resistance Gene after Short-Term International Travel to Vietnam." *Infect Drug Resist* 11: 391–95.
- Nang, S. C., J. Li, and T. Velkov. 2019. "The Rise and Spread of *Mcr* Plasmid-Mediated Polymyxin Resistance." *Crit Rev Microbiol* 45 (2): 131–61.
- Nicoloff, H., and D. I. Andersson. 2016. "Indirect Resistance to Several Classes of Antibiotics in Cocultures with Resistant Bacteria Expressing Antibiotic-Modifying or -Degrading Enzymes." *J Antimicrob Chemother* 71: 100–110.
- OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development. "Antibiotic Use and Antibiotic Resistance in Food Producing Animals in China 2018." [http://https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=TAD/CA/APM/WP\(2018\)19/FINAL&docLanguage=En](http://https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=TAD/CA/APM/WP(2018)19/FINAL&docLanguage=En), July 2020.
- \* Ortwine, J. K., K. S. Kaye, J. Li, and J. M. Pogue. 2015. "Colistin: Understanding and Applying Recent Pharmacokinetic Advances." *Pharmacotherapy* 35 (1): 11–16.
- Orwa, J. A., C. Govaerts, R. Busson, E. Roets, A. Van Schepdael, and J. Hoogmartens. 2001. "Isolation and Structural Characterization of Colistin Components." *J. Antibiot (Tokyo)* 54 (7): 595–99.
- Ovejero, C. M., J. F. Delgado-Blas, W. Calero-Caceres, M. Muniesa, and B. Gonzalez-Zorn. 2017. "Spread of *Mcr-1*-Carrying Enterobacteriaceae in Sewage Water from Spain." *J Antimicrob Chemother* 72 (4): 1050–53.
- Peirano, G., J. Ahmed-Bentley, J. Fuller, J. E. Rubin, and D. D. Pitout. 2014. "Travel-Related Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria in Alberta, Canada: The First 3 Years." *J Clin Microbiol* 52 (5): 1575–81.
- Perrin-Guyomad, A., M. Bruneau, P. Houée, K. Deleurme, P. Legrandois, C. Poirier, C. Soumet, and P. Sanders. 2016. "Prevalence of *Mcr-1* in Commensal *Escherichia Coli* from French Livestock, 2007 to 2014." *Euro Surveill* 21 (6): 1–3.
- \* Poirel, L., J. Aurélie, and P. Nordmann. 2017. "Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes." *Clin Microbiol Rev* 30 (2): 557–96.
- Poirel, L., N. Kieffer, and P. Nordmann. 2017. "In Vitro Study of IS *Apl1*-Mediated Mobilization of the Colistin Resistance Gene *Mcr-1*." *Antimicrob Agents Chemother* 61 (7): 1–5.
- Pomorská, K., V. Jakubů, M. Zelendová, M. Dolejská, and H. Žemličková. 2018. "Záchyt Plazmidy Determinované Rezistence Ke Kolistinu Zprostředkované Geny *mcr* v České Republice." *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 27 (9): 219–22.
- Pristovšek, P., and J. Kidrič. 1999. "Solution Structure of Polymyxins B and E and Effect of Binding to Lipopolysaccharide: An NMR and Molecular Modeling Study." *J Med Chem* 42 (22): 4604–13.

- Quan, J., X. Li, Y. Chen, Y. Jiang, Z. Zhou, H. Zhang, L. Sun, et al. 2017. "Prevalence of *Mcr-I* in *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae* Recovered from Bloodstream Infections in China: A Multicentre Longitudinal Study." *Lancet Infect Dis* 17 (4): 400–410.
- QYResearch Medical Research Centre. "The global polymyxin industry report 2015." Srpen, 2015. <http://www.qyresearch.com>.
- QYResearch Medical Research Centre. "Global colistin sulphate market research report 2019." Duben, 2019. <http://www.qyresearch.com>.
- Ramos, P. I. P., M. G. F. Custódio, G. del R. Q. Saji, T. Cardoso, G. L. da Silva, G. Braun, W. M. B. S. Martins, et al. 2016. "The Polymyxin B-Induced Transcriptomic Response of a Clinical, Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Involves Multiple Regulatory Elements and Intracellular Targets." *BMC Genomics* 17 (Suppl 8):737.
- Rice, L. B. 2008. "Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE." *J Infect Dis* 197 (8): 1079–81.
- Rodríguez-Verdugo, A., B. S. Gaut, and O. Tenaillon. 2013. "Evolution of *Escherichia Coli* Rifampicin Resistance in an Antibiotic-Free Environment during Thermal Stress." *BMC Evol Biol* 13:50.
- Rubin, E. J., C. M. Herrera, A. A. Crofts, and M. Stephen. 2015. "PmrD Is Required for Modifications to *Escherichia Coli* Endotoxin That Promote Antimicrobial Resistance." *Antimicrob Agents Chemother* 59 (4): 2051–61.
- Saavedra, S. Y., L. Diaz, M. Wiesner, A. Correa, S. A. Arévalo, J. Reyes, A. M. Hidalgo, et al. 2017. "Genomic and Molecular Characterization of Clinical Isolates of Enterobacteriaceae Harboring *mcr-I* in Colombia, 2002 to 2016." *Antimicrob Agents Chemother* 61 (12): 1–13.
- Saly, M., A. Jayol, L. Poirel, F. Megraud, P. Nordmann, and V. Dubois. 2017. "Prevalence of Faecal Carriage of Colistin-Resistant Gram- Negative Rods in a University Hospital in Western France, 2016." *J Med Microbiol* 66 (6): 842–43.
- Sassera, D., F. Comandatore, P. Gaibani, G. D'Auria, M. Mariconti, M. P. Landini, V. Sambri, and P. Marone. 2014. "Comparative Genomics of Closely Related Strains of *Klebsiella Pneumoniae* Reveals Genes Possibly Involved in Colistin Resistance." *Ann Microbiol* 64 (2): 887–90.
- Schaumburg, F., S. M. Sertic, C. Correa-Martinez, A. Mellmann, R. Köck, and K. Becker. 2019. "Acquisition and Colonization Dynamics of Antimicrobial-Resistant Bacteria during International Travel: A Prospective Cohort Study." *Clin Microbiol Infect* 25 (10): 1287. e1-1287.e7.
- Schurek, K. N., J. L. M. Sampaio, C. R. V. Kiffer, S. Sinto, C. M. F. Mendes, and R. E. W. Hancock. 2009. "Involvement of PmrAB and PhoPQ in Polymyxin B Adaptation and Inducible Resistance in Non-Cystic Fibrosis Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* 53 (10): 4345–51.
- Schwartz, B. S., M. R. Warren, F. A. Barkley, and L. Landis. 1959. "Microbiological and Pharmacological Studies of Colistin Sulfate and Sodium Colistinmethanesulfonate." *Antibiot Annu* 7: 41–60.
- Seifi, S., and R. Khoshbakht. 2016. "Prevalence of Tetracycline Resistance Determinants in Broiler Isolated *Escherichia Coli* in Iran." *Br Poult Sci* 57 (6): 729–33.
- Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad Alimentaria. [National Service of Agricultural Health and Food Safety]. Registro de Productos de Uso Veterinario e Insumos Pecuarios. [Registration of Products for Veterinary Use and Livestock Supplies]. Bolivia: SENASAG; 2018. Spanish. Dostupné z: <http://190.129.48.189/egp/productosVeterinarios.html>
- Shen, C., L.-L. Zhong, Y. Yang, Y. Doi, D. L. Paterson, N. Stoesser, F. Ma, et al. 2020. "Dynamics of *mcr-I* Prevalence and *mcr-I*-Positive *Escherichia Coli* after the Cessation of Colistin Use as a Feed



- Additive for Animals in China: A Prospective Cross-Sectional and Whole Genome Sequencing-Based Molecular Epidemiological Study.” *Lancet Microbe* 1 (1): e34–e43.
- Shen, Z., Y. Wang, Y. Shen, J. Shen, and C. Wu. 2016. “Early Emergence of *Mcr-1* in *Escherichia Coli* from Food-Producing.” *Lancet Infect Dis* 16 (3): 293.
- Shin, S. W., M. K. Shin, M. Jung, M. K. Belaynehe, and S. H. Yoo. 2015. “Prevalence of Antimicrobial Resistance and Transfer of Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia Coli* Isolates from Beef Cattle.” *Appl Environ Microbiol* 81 (16): 5560–66.
- Sidorczyk, Z., U. Zähringer, and E. T. Rietschel. 1983. “Chemical Structure of the Lipid A Component of the Lipopolysaccharide from a *Proteus Mirabilis* Re-Mutant.” *Eur J Biochem* 137 (1–2): 15–22.
- Skov, R. L., and D. L. Monnet. 2016. “Plasmid-Mediated Colistin Resistance (*Mcr-1* Gene): Three Months Later, the Story Unfolds.” *Euro Surveill* 21 (9): 1–6.
- Sota, M., H. Yano, J. Hughes, G. W. Daughdrill, Z. Abdo, L. J. Forney, and E. M. Top. 2010. “Shifts in Host Range of a Promiscuous Plasmid through Parallel Evolution of Its Replication Initiation Protein.” *ISME J* 4 (12): 1568–80.
- SÚKL: Státní ústav pro kontrolu léčiv. “Polymyxiny (kolistin a CMS) – ukončeno celoevropské přehodnocení.” [online]. Praha 2015 [cit. 2020]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/polymyxiny-kolistin-a-cms-ukonceno-celoevropske-prehodnoceni>.
- Sun, D., Y. Zhang, Y. Mei, H. Jiang, Z. Xie, H. Liu, X. Chen, and P. Shen. 2006. “*Escherichia Coli* Is Naturally Transformable in a Novel Transformation System.” *FEMS Microbiol Lett* 265 (2): 249–55.
- Sun, J., C. Chen, C.-Y. Cui, Y. Zhang, X. Liu, Z.-H. Cui, X.-Y. Ma, et al. 2019. “Plasmid-Encoded Tet(X) Genes That Confer High-Level Tigecycline Resistance in *Escherichia Coli*.” *Nat Microbiol* 4 (9): 1457–64.
- Taylor, N. G. H., D. W. Verner-Jeffreys, and C. Baker-Austin. 2011. “Aquatic Systems: Maintaining, Mixing and Mobilising Antimicrobial Resistance?” *Trends Ecol Evol* 26 (6): 278–84.
- Telke, A. A., A. O. Olaitan, S. Morand, and J.-M. Rolain. 2017. “SoxRS Induces Colistin Hetero-Resistance in *Enterobacter Asburiae* and *Enterobacter Cloacae* by Regulating the AcrAB-TolC Efflux Pump.” *J Antimicrob Chemother* 72 (10): 2715–21.
- Teo, J. W., K. L. Chew, and R. T. Lin. 2016. “Transmissible Colistin Resistance Encoded by *Mcr-1* Detected in Clinical Enterobacteriaceae Isolates in Singapore.” *Emerg Microbes Infect* 5 (8): e87.
- Terveer, E. M., R. H. T. Nijhuis, M. J. T. Crobach, C. W. K. Knetsch, K. E. Veldkamp, J. Gooskens, E. J. Kuijper, and E. C. J. Claas. 2017. “Prevalence of Colistin Resistance Gene (*Mcr-1*) Containing Enterobacteriaceae in Feces of Patients Attending a Tertiary Care Hospital and Detection of a *Mcr-1* Containing, Colistin Susceptible *E. Coli*.” *PLoS One* 12 (6): 1–9.
- Tietgen, M., T. Semmler, S. Riedel-Christ, V. A. J. Kempf, A. Molinaro, C. Ewers, and S. Göttig. 2018. “Impact of the Colistin Resistance Gene *Mcr-1* on Bacterial Fitness.” *Int J Antimicrob Agents* 51 (4): 554–61.
- \* Trimble, M. J., P. Mlynářčík, M. Kolář, and R. E. W. Hancock. 2016. “Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action.” *Cold Spring Harb Perspect Med* 6 (10): 1–22.
- Trung, N. V., S. Matamoros, J. J. Carrique-Mas, N. H. Nghia, N. T. Nhung, T. T. B. Chieu, H. H. Mai, et al. 2017. “Zoonotic Transmission of *Mcr-1* Colistin Resistance Gene from Small-Scale Poultry Farms, Vietnam.” *Emerg Infect Dis* 23 (3): 529–32.
- ÚSKVBL (2019): “Spotřeba antimikrobik ve veterinární medicíně v ČR: Detailní komentované srovnání spotřeb antimikrobik 2010-2017“, p.1–39, [www.uskkvbl.cz](http://www.uskkvbl.cz)

- Vading, M., M. H. Kabir, M. Kalin, A. Iversen, S. Wiklund, P. Naucclér, and C. G. Giske. 2016. "Frequent Acquisition of Low-Virulence Strains of ESBL-Producing *Escherichia Coli* in Travellers." *J Antimicrob Chemother* 71 (12): 3548–55.
- Velkov, T., K. D. Roberts, R. L. Nation, P. E. Thompson, and J. Li. 2013. "Pharmacology of Polymyxins: New Insights into an 'Old' Class of Antibiotics." *Future Microbiol* 8 (6): 1–20.
- Villegas, M.-V., M. Ozdamar, and L. Poirel. 2015. "The MgrB Gene as a Key Target for Acquired Resistance to Colistin in *Klebsiella Pneumoniae*." *J Antimicrob Chemother* 70 (1): 75–80.
- Walsh, T. R., and Y. Wu. 2016. "China bans colistin as a feedadditive for animals." *Lancet Infect Dis* 16 (10): 1102–1103.
- Wand, M. E., L. J. Bock, L. C. Bonney, and J. M. Sutton. 2016. "Mechanisms of Increased Resistance to Chlorhexidine and Cross-Resistance to Colistin Following Exposure of *Klebsiella Pneumoniae* Clinical Isolates to Chlorhexidine." *Antimicrob Agents Chemother* 61 (1): 1–12.
- Wang, C., Y. Feng, L. Liu, L. Wei, M. Kang, and Z. Zong. 2020. "Identification of Novel Mobile Colistin Resistance Gene *Mcr-10*." *Emerg Microbes Infect* 9 (1): 508–16.
- Wang, L., D. Liu, Y. Lv, L. Cui, T. Li, H. Song, Y. Hao, J. Shen, Y. Wang, and T. R. Walsh. 2019. "Novel Plasmid-Mediated Tet(X5) Gene Conferring Resistance to Tigecycline, Eravacycline, and Omadacycline in a Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolate." *Antimicrob Agents Chemother* 64 (1): 1–5.
- Wang, Q., J. Sun, J. Li, Y. Ding, X.-P. Li, J. Lin, B. Hassan, and Y. Feng. 2017. "Expanding Landscapes of the Diversified *mcr-1*-Bearing Plasmid Reservoirs." *Microbiome* 5 (1): 1–9.
- Wang, X., Y. Wang, Y. Zhou, J. Li, W. Yin, S. Wang, J. Shen, Z. Shen, and Y. Wang. 2018. "Emergence of a Novel Mobile Colistin Resistance Gene, *Mcr-8*, in NDM-Producing *Klebsiella Pneumoniae*." *Emerg Microbes Infect* 7 (1): 122.
- Wang, Y., F. Liu, B. Zhu, and G. F. Gao. 2020. "Metagenomic Data Screening Reveals the Distribution of Mobilized Resistance Genes Tet(X), *Mcr* and Carbapenemase in Animals and Humans." *J Infect* 80 (1): 121–42.
- Wang, Y., F. Liu, Y. Hu, G. Zhang, B. Zhu, and G. F. Gao. 2019. "Detection of Mobile Colistin Resistance Gene *mcr-9* in Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Strains of Human Origin in Europe." *J Infect* 80 (5): 578–606.
- Wang, Y., G.-B. Tian, R. Zhang, Y. Shen, J. M. Tyrrell, X. Huang, H. Zhou, et al. 2017. "Prevalence, Risk Factors, Outcomes, and Molecular Epidemiology of *Mcr-1*-Positive Enterobacteriaceae in Patients and Healthy Adults from China: An Epidemiological and Clinical Study." *Lancet Infect Dis* 17 (4): 390–99.
- Wang, Y., C. Xu, R. Zhang, Y. Chen, Y. Shen, F. Hu, D. Liu, et al. 2020. "Changes in Colistin Resistance and *mcr-1* Abundance in *Escherichia coli* of Animal and Human Origins Following the Ban of Colistin-Positive Additives in China: An Epidemiological Comparative Study." *Lancet Infect Dis* S1473-3099 (20) 30149-3.
- Wick, R. R., L. M. Judd, C. L. Gorrie, K. E. Holt. 2017. "Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads." *PLoS Comput Biol* 13 (6): e1005595.
- Wintersdorff, C. J. H., P. F. G. Wolffs, J. M. van Niekerk, E. Beuken, L. B. van Alphen, E. E. Stobberingh, A. M. L. O. Lashof, C. J. P. A. Hoebe, P. H. M. Savelkoul, and J. Penders. 2016. "Detection of the Plasmid-Mediated Colistin-Resistance Gene *Mcr-1* in Faecal Metagenomes of Dutch Travellers." *J Antimicrob Chemother* 71 (12): 3416–19.
- Wirth, T., D. Falush, R. Lan, F. Colles, P. Mensa, L. H. Wieler, H. Karch, et al. 2006. "Sex and Virulence in *Escherichia Coli*: An Evolutionary Perspective." *Mol Microbiol* 60 (5): 1136–51.

- Wösten, M. M., and E. A. Groisman. 1999. "Molecular Characterization of the PmrA Regulon" 274 (38): 27185–90.
- Wösten, M. M., L. F. Kox, S. Chamnongpol, F. C. Soncini, and E. A. Groisman. 2000. "A Signal Transduction System That Responds to Extracellular Iron." *Cell* 103 (1): 113–25.
- Wright, M. S., Y. Suzuki, M. B. Jones, S. H. Marshall, S. D. Rudin, D. van Duin, K. Kaye, M. R. Jacobs, R. A. Bonomo, and D. Adams. 2015. "Genomic and Transcriptomic Analyses of Colistin-Resistant Clinical Isolates of *Klebsiella Pneumoniae* Reveal Multiple Pathways of Resistance." *Antimicrob Agents Chemother* 59 (1): 536–543.
- Wu, R., L.-X. Yi, L.-F. Yu, J. Wang, Y. Liu, X. Chen, and L. Lv. 2018. "Fitness Advantage of *mcr-1*–Bearing IncI2 and IncX4 Plasmids in Vitro." *Front Microbiol* 9: 331.
- Xavier, B. B., C. Lammens, R. Ruhel, S. Kumar-Singh, P. Butaye, H. Goossens, and S. Malhotra-Kumar. 2016. "Identification of a Novel Plasmid-Mediated Colistin-Resistance Gene, *mcr-2*, in *Escherichia Coli*, Belgium, June 2016." *Euro Surveill* 21 (27): 6–11.
- Yang, Q., M. Li, O. B. Spiller, D. O. Andrey, P. Hinchliffe, H. Li, C. Maclean, et al. 2017. "Balancing *mcr-1* Expression and Bacterial Survival Is a Delicate Equilibrium between Essential Cellular Defence Mechanisms." *Nat Commun* 8 (1): 2054.
- Yang, Y.-Q., Y.-X. Li, C.-W. Lei, A.-Y. Zhang, and H.-N. Wang. 2018. "Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *Mcr-7.1* in *Klebsiella Pneumoniae*." *J Antimicrob Chemother* 73 (7): 5–9.
- Yin, W., H. Li, Y. Shen, Z. Liu, S. Wang, Z. Shen, R. Zhang, T. R. Walsh, J. Shen, and Y. Wang. 2017. "Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *Mcr-3* in *Escherichia Coli*." *MBio* 8 (3): 1–6.
- Yin, W., H. Li, Y. Shen, Z. Liu, S. Wang, Z. Shen, R. Zhang, T. R. Walsh, J. Shen, and Y. Wang. 2017. "Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *Mcr-3* in *Escherichia Coli*." *MBio* 8 (3): 4–9.
- Yoon, E.-J., J. S. Hong, J. W. Yang, K. J. Lee, H. Lee, and S. H. Jeong. 2018. "Detection of *Mcr-1* Plasmids in Enterobacteriaceae Isolates From Human Specimens: Comparison With Those in *Escherichia Coli* Isolates From Livestock in Korea." *Ann Lab Med* 38 (6): 555–62.
- Yuan, Y., Y. Li, G. Wang, C. Li, L. Xiang, J. She, J. Yang, F. Zhong, and L. Zhang. 2019. "Coproduction Of MCR-9 And NDM-1 By Colistin-Resistant *Enterobacter Hormaechei* Isolated From Bloodstream Infection." *Infect Drug Resist* 12: 2979–85.
- Zajac, M., P. Sztromwasser, V. Bortolaia, P. Leekitcharoenphon, L. M. Cavaco, A. Ziętek-Barszcz, R. S. Hendriksen, and D. Wasyl. 2019. "Occurrence and Characterization of *Mcr-1*-Positive *Escherichia Coli* Isolated From Food-Producing Animals in Poland, 2011–2016." *Front Microbiol* 10:1753: 1–14.
- \* Zeng, X., and J. Lin. 2017. "Factors Influencing Horizontal Gene Transfer in the Intestine." *Anim Health Res Rev* 18 (2): 153–59.
- Zhong, L.-L., H. T. T. Phan, C. Shen, K.-D. Vihta, A. E. Sheppard, X. Huang, K.-J. Zeng, et al. 2018. "High Rates of Human Fecal Carriage of *Mcr-1*–Positive Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae Emerge in China in Association With Successful Plasmid Families." *Clin Infect Dis* 66 (5): 676–85.
- Zhou, H.-W., T. Zhang, J.-H. Ma, Y. Fang, H.-Y. Wang, Z.-X. Huang, Y. Wang, C. Wu, and G.-X. Chen. 2017. "Occurrence of Plasmid- and Chromosome-Carried *Mcr-1* in Waterborne Enterobacteriaceae in China" 61 (8): 1–9.
- Zurfluh, K., R. Stephan, A. Widmer, L. Poirel, P. Nordmann, H.-J. Nüesch, H. Hächler, and M. Nüesch-Inderbilen. 2017. "Screening for Fecal Carriage of MCR- Producing Enterobacteriaceae in Healthy Humans and Primary Care Patients." *Antimicrob Resist Infect Control* 6:28: 7–10.
- Zurfluh, K., L. Poirel, P. Nordmann, M. Nüesch-Inderbilen, H. Hächler, and R. Stephan. 2016. "Occurrence of the Plasmid-Borne *mcr-1* Colistin Resistance Gene in River Water and Imported Vegetable Samples in Switzerland." *Antimicrob Agents Chemother* 60 (4): 2594–95.

\* značí sekundární zdroj